

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität in Marburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Schmid

MARBURG

1967

**Synthese und Umsatz der Nukleinsäuren
während der Lebervergrößerung
durch chronische Phenobarbitaleinwirkung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Wolfgang Schulz

aus Alt - Tschau

Marburg 1967

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität in Marburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Schmid

Synthese und Umsatz der Nukleinsäuren
während der Lebervergrößerung
durch chronische Phenobarbitaleinwirkung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Wolfgang Schulz

aus Alt - Tschau

Marburg 1967

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 14. 12. 1967,
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan:	Prof. Dr. med. R. Siegert
Referent:	Prof. Dr. med. H. W. Kunz
Correferent:	Prof. Dr. med. W. Schmid

Gliederung

A. Einleitung

B. Material und Methode

1. Tiermaterial, Vorbehandlung und Applikation
2. Herstellung der Leberzellfraktionen
3. Extraktion der RNS aus den Zellfraktionen
4. Arbeitsgang zur Bestimmung von DNS im Gesamthomogenat
5. Bestimmung der freien Nukleotide
6. Analysemethoden
 - a. RNS - Bestimmung mit der Orcinmethode
 - b. DNS - Bestimmung mit der Diphenylaminmethode
 - c. Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäuren
 - d. Bestimmung der Radioaktivität
7. Fehlerberechnung und statistische Beurteilung

C. Experimenteller Teil

I. Nukleinsäuregehalte und Nukleinsäuresynthese in der Leber unbehandelter Tiere

1. Physiologischer Variationsbereich der Nukleinsäuresynthese in der Leber
2. Abhängigkeit der Nukleinsäuremarkierung von der Einwirkungsdauer der markierten Vorstufen
3. Abhängigkeit der Inkorporationsrate von den angewandten Nukleinsäurevorstufen
4. Mittlere RNS - Gehalte und mittlere Inkorporationsraten von H^3 - Urcil in der Leber unbehandelter Tiere

II. Nukleinsäuregehalte und Nukleinsäuresynthese in der Leber phenobarbitalbehandelter Tiere

1. Verlauf der Lebervergrößerung unter der Einwirkung von Phenobarbital
2. Beeinflussung der Nukleinsäuregehalte der Leber durch Phenobarbital
3. Beeinflussung des Einbaues von H^3 - Urcil in die Nukleinsäuren

4. Beeinflussung von Gehalt und Syntheserate von RNS
im Verlauf chronischer Phenobarbitaleinwirkung
 5. Die Beeinflussung der Inkorporationsrate von
 H^3 - Uridin
 6. Die Beeinflussung der Inkorporationsrate von
 H^3 - Orotsäure
- III. DNS - Synthese in der Leber unbehandelter Tiere
und Beeinflussung der DNS - Synthese durch Pheno-
barbitalbehandlung

D. Diskussion

E. Literaturverzeichnis

F. Tabellenanhang

A. Einleitung

Bei chronischer Zufuhr vieler Fremdstoffe tritt im Tierexperiment eine beträchtliche, bis zur Verdopplung des Organvolumens führende Lebervergrößerung auf (1). Der Gewichtsanstieg ist mit einer annähernd parallellaufenden Zunahme von Protein-, Lipoid-, RNS- und DNS - Gehalten verbunden. Die Leberenzyme steigen unter weitgehender Beibehaltung ihrer Proportionskonstanz an (2). Die pharmakainduzierte Leberhypertrophie beruht demnach auf einer Vermehrung funktionell aktiver Organsubstanz. Ursache, kausale Mechanismen und Bedeutung dieses Phänomens sind noch weitgehend ungeklärt. Im wesentlichen sind zwei Prinzipien zu diskutieren.

1. Primäre Ursache der Organvergrößerung ist die durch direkte Induktionsmechanismen erfolgende Vermehrung spezifischer Enzymkomplexe und der sie tragenden Zellstrukturen. Primär ausgelöst werden von den Barbituraten und ähnlich wirkenden Fremdstoffen der Anstieg der mikrosomalen Enzyme des Pharmakaabbaues und die damit einhergehende Vermehrung des glatten Retikulums (3), von Halothan und anderen halogenierten Verbindungen die Vergrößerung mitochondrialer Zellanteile (4), von p-Chlorphenoxisobuttersäure die Zunahme von Mikrobodies und Peroxysomen (5). Die Neusynthese, die Strukturerhaltung und die gesteigerte Funktion dieser primär aktivierten Systeme bewirkt sekundär eine Induktion zahlreicher mitochondrialer und zytoplasmatischer Enzyme, die zum Syntheseparat der Zelle gehören. Die Lebervergrößerung würde demnach auf der Zunahme dieser umfangreichen Enzymgruppen beruhen. Es liegt also eine funktionelle Hypertrophie spezieller Zellanteile durch eine Kette sich bedingender Enzyminduktionen vor.

2. Als zweites Wirkungsprinzip ist zu diskutieren, daß die Pharmaka, ihre Metabolite oder die durch die Metabolisierung ausgelösten Stoffwechselreaktionen in ein Zellwachstum und Zellvermehrung steuerndes Regulationssystem eingreifen und dadurch echtes proportioniertes Organwachstum auslösen.

Die bisher vorliegenden experimentellen Daten liefern für beide Hypothesen Argumente und Gegenargumente. Wesentliche Hinweise für eine Entscheidung waren von eingehenden Analysen des Nukleinsäurestoffwechsels zu erwarten, da beide Wirkungsprinzipien sich in einer differenten Beeinflussung der einzelnen Nukleinsäuretypen ausprägen müßten.

Bei Vorliegen einer Enzyminduktionskette wäre vor allem eine Neubildung von m-RNS zu erwarten, wie sie von Sekeris et al. (6) bei der Enzyminduktion durch Hydrocortison nachgewiesen wurde. Bei einer primären Beeinflussung des generativen Stoffwechsels wäre darüber hinaus eine kongruente Erhöhung der Synthese aller Nukleinsäureformen zu erwarten. Es müßte in diesem Falle eine Stimulierung der Nukleinsäuresynthese auftreten, wie sie von Bush und anderen (7), (8) in der nach Teilhepatektomie regenerierenden Leber und in Hepatomen beobachtet wurden. Hinweise für die Synthese der einzelnen Nukleinsäureformen während verschiedener Generationsstadien geben ebenfalls Untersuchungen bei befruchteten Seeigeleiern (9), (10). Hier wurde während der Differenzierungsphase eine wahrscheinlich auf Endaddition beruhende Inkorporation von RNS - Vorstufen in plasmatische t-RNS und eine weniger starke Inkorporation in m-RNS gefunden, während der Vermehrungsphase dagegen eine gesteigerte Neubildung von hochmolekularer RNS und DNS.

Um Einblick in den Ablauf der pharmakainduzierten Lebervergrößerung zu erhalten, wurden aufgrund dieser Überlegungen in der vorliegenden Arbeit analoge Analysen des Nukleinsäurestoffwechsels durchgeführt. Dazu wurden nach Pulsmarkierung mit markierten Nukleinsäurevorstufen während des ganzen Verlaufs und nach Abschluß der Wachstumsphase die einzelnen Nukleinsäureformen nach der Methode von Georgiev und Mantieva durch fraktionierte Extraktion gewonnen (11, 12). Durch die Bestimmung der Gesamtgehalte, der Gesamtaktivitäten und der spezifischen Aktivitäten wurden Syntheseraten und Umsätze der Fraktionen beurteilt.

B. Material und Methoden

1. Tiermaterial, Vorbehandlung und Applikation

a. Tiermaterial

Alle Versuche wurden mit männlichen Albino-mäusen des Z2 - Inzuchtstammes der Bundesforschungs-anstalt für Viruserkrankungen der Tiere, Tübingen, durchgeführt, Lieferant Ivanovas Kisslegg. Die für eine Versuchsreihe verwandten Tiere stammten aus der gleichen Lieferung, waren gleichalt und annähernd gleichschwer. Sie wurden nach Eintreffen vom Züchter etwa 14 Tage lang an die Stall- und Ernährungsbedin-gungen unseres Instituts gewöhnt. Die Tiere wurden in vollklimatisierten Räumen mit künstlicher Beleuch-tung gehalten. Sie erhielten Preßfutter Altrumin der Firma Altrogge, Brackwede, und Leitungswasser aus Saugflaschen ad libitum.

b. Applikation von Phenobarbital

Phenobarbitalnatrium Merck wurde den Ver-suchstieren 0,1%ig im Trinkwasser verabreicht. Bei einer durchschnittlichen Trinkmenge von 5ml pro Tag entspricht das bei einem 30g schweren Tier einer täg-lichen Phenobarbitalaufnahme von 150mg/kg Tiergewicht.

c. Applikation markierter Nukleinsäurevorstufen

Die Versuche wurden mit den nachfolgend aufgeführten markierten Verbindungen durchgeführt.

1. Uracil - 2 - C¹⁴
2. Uracil - 5 - H³
3. Uracil - U - H³
4. Uridin - 5 - H³
5. Orotsäure - 6 - C¹⁴
6. Orotsäure - 5 - H³
7. Thymin - U - H³

Bezogen wurden diese Substanzen vom Radiochemical Center, Amersham, England.

Die Applikation der Vorstufen erfolgte immer zur gleichen Zeit morgens um 8⁰⁰ durch intraperitoneale Injektion von 1 bzw. 2 μ c pro Gramm Körpergewicht bei tritierten Verbindungen und von 0,1 bzw. 0,2 μ c pro Gramm Körpergewicht bei C¹⁴-markierten Verbindungen. Die Verbindungen waren in steriler Kochsalzlösung so gelöst, daß durch Injektion von 0,1ml pro 10g Tiergewicht die gewünschte Dosierung erhalten wurde.

2. Herstellung der Leberzellfraktionen

a. Kernpräparation

Verwendete Lösungen:

Lösung A: 0,05m Tris/HCl-Puffer pH 7,6 + 0,025m KCl
+ 0,01m MgCl + 0,25m Saccharose.

Lösung B: Triton X 1%ig

Die Tiere wurden 1 bzw. 2 Stunden nach der Injektion im Kühlraum bei +2°C dekapitiert; die präparativ entfernte Leber wurde gewogen und mit 10ml der Lösung A in einem Potter-Glashomogenisator mit einem Teflonstempel mit 20 Stempelpassagen innerhalb einer Minute homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 Minuten bei 800 g in einer Christzentrifuge zentrifugiert. - Der Überstand wurde in Ultrazentrifugengläser abgegossen. - Das Sediment wurde noch einmal in 10ml Lösung A und in 10ml Lösung B suspendiert und erneut 10 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag nach Resuspendierung in 10ml Lösung A nochmals zentrifugiert. Das so erhaltene Sediment stellt die Kernfraktion dar.

b. Präparation der Mikrosomenfraktion

Der Überstand der ersten Homogenatzentrifugation wurde in einer MSE-Ultrazentrifuge eine Stunde bei 105000 g bei -1°C zentrifugiert. Das so gewonnene Sediment enthält Mitochondrien und Mikrosomen. Da der RNS - Gehalt der Mitochondrienfraktion vernachlässigt werden kann, wurde dieses Gesamtsediment zur Bestimmung der Mikrosomen - RNS verwandt. Es wird im folgenden als Mikrosomenfraktion bezeichnet. Der Überstand der 105000 g - Zentrifugation stellt die Plasmafraktion dar.

3. Extraktion der RNS aus den Zellfraktionen

Verwandte Lösungen:

Lösung C: 0,03m Phosphatpuffer pH 6,8 + 0,14m NaCl

Lösung D: 0,3%iges Natriumdesoxycholat

Lösung E: 0,3%iges Natriumdodecylsulfat

Lösung F: wassergesättigtes Phenol

a. Fraktionierte Extraktion der Kerne nach Georgiev und Mantieva

Die Leberkerne wurden in 15,0ml Lösung C und 0,5ml Lösung D langsam bei -8°C eingefroren und schnell wieder aufgetaut. Diese Suspension wurde mit 15,0ml der Lösung F bei 50°C 20 Minuten lang im Wasserbad geschüttelt. Danach wurde die wäßrige Phase von der Phenolphase durch 20 Minuten langes Zentrifugieren bei 10000 g getrennt. Nach Abpipettieren der wäßrigen Phase wurde die Zwischenschicht noch einmal in 15,0ml Lösung C und 0,5ml Lösung D und 15,0ml Lösung F aufgenommen, 20 Minuten bei 65°C im Wasserbad geschüttelt, wie oben zentrifugiert und die wäßrige Phase erneut abpipettiert. Die so erhaltenen wäßrigen Phasen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -2°C aufbewahrt.

b. Fraktionierte Extraktion der RNS aus Mikrosomen

Dieser Arbeitsgang unterscheidet sich von der Kernfraktionierung nur durch das Nichteinfrieren der Mikrosomen.

c. Extraktion der RNS aus dem Plasma

Die Plasmafraktion wurde in 20,0ml absolutem Alkohol aufgenommen und in der Kälte 3 Stunden stehen gelassen, danach bei 15000 g abzentrifugiert, das Sediment in 15,0ml Lösung C, 0,5ml Lösung D und 15,0ml Lösung F suspendiert, bei 65°C 20 Minuten im Wasserbad geschüttelt und danach behandelt, wie unter Extraktion von RNS aus Kernen angegeben.

d. Fällung und Reinigung der extrahierten RNS

Alle wäßrigen Phasen wurden in gleicher Weise behandelt. In der Kälte wurden sie in Schütteltrichter gefüllt und zweimal zur Entfernung des Phenols mit Äther ausgeschüttelt, der Äther danach mit Stickstoff ausgeblubbert und die einzelnen Mengen mit Lösung C auf jeweils 15,0ml aufgefüllt. Bei den Versuchen 1 bis 14 wurden die Nukleinsäuren aus der wäßrigen Phase durch Zugabe des doppelten Volumens absoluten Alkohols gefällt. Die Niederschläge wurden nach zwölfstündigem Stehen bei 0°C durch Zentrifugieren abgetrennt, nochmals mit absolutem Alkohol gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren in 10,0ml einer 0,2m NaCl - Lösung gelöst. Davon wurden 0,5ml zur RNS - Bestimmung mit der Orcinmethode, zur DNS - Bestimmung nach Dische mit der Diphenylaminmethode und zur spektrophotometrischen Bestimmung der Gesamtnukleinsäuren bei 260m μ entnommen. Da sich bei den ersten Versuchen gezeigt hatte, daß der Anteil der DNS - Beimengungen vernachlässigt werden konnte, wurde nach Versuch 4 auf die DNS - Bestimmung verzichtet.

Die verbleibenden 9,5ml der Nukleinsäurelösung wurden mit dem 2,5fachen Volumen Alkohol erneut gefällt, nochmals mit absolutem Alkohol nachgewaschen und zur Bestimmung der Aktivität in Hyamin aufgenommen. Um eine Mitfällung freier Nukleotide sicher zu vermeiden, modifizierten wir die Nukleinsäurefällung ab Versuch 15. Die Nukleinsäuren wurden jetzt bei 0°C mit 1/10 Volumen einer 5n Perchlorsäure aus den wäßrigen Phasen ausgefällt, das Sediment nach dreistündigem Stehen bei 0°C zentrifugiert und noch einmal mit absolutem Alkohol nachgewaschen. Von dem Niederschlag wurden gleiche Teile zur chemischen Analyse in 0,2m Kochsalzlösung aufgenommen bzw. zur Bestimmung der Radioaktivität in Hyamin gelöst.

4. Arbeitsgang zur Bestimmung von DNS im Gesamthomogenat

Verwendete Lösungen:

Lösung C: 0,03m Phosphatpuffer pH 6,8 + 1m NaCl

Lösung D: 25%iges Natriumlaurylsulfat

Zwei Stunden nach intraperitonealer Injektion von radioaktivem Thymin wurden die Versuchstiere in der Kälte dekapitiert, die Leber präparativ gewonnen, gewogen, mit 15,0ml Lösung C und 1ml Lösung D in einem Potter-Glashomogenator mit dem Ultrathurax bis zum Erreichen einer homogenen Suspension zerkleinert. Diese Suspension wurde mit 15,0ml Lösung F bei 65°C eine Stunde lang im Wasserbad geschüttelt, danach wurde die wäßrige von der Phenolphase durch 20 Minuten langes Zentrifugieren bei 10000 g getrennt. Nach Abpipettieren der wäßrigen Phase wurde die Zwischenschicht noch einmal in 15,0ml Lösung C, 1,0ml Lösung D und 15,0ml Lösung F 15 Minuten bei 65°C nachextrahiert.

Die beiden so gewonnenen wäßrigen Phasen wurden vereinigt, in der Kälte in Schütteltrichter gefüllt, zweimal mit Äther ausgeschüttelt, mit Stickstoff ausgeblubbert, danach mit Lösung C auf 30,0ml aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden 3,0ml zur DNS - Bestimmung nach Dische entnommen. Die restlichen 27,0ml wurden mit 3,0ml einer 50%igen Perchlorsäure gefällt und drei Stunden in der Kälte stehen gelassen, danach zentrifugiert und zweimal mit absolutem Alkohol nachgewaschen.

5. Bestimmung der freien Nukleotide

Nach Ausfällen der Nukleinsäuren mit 5n Perchlorsäure oder dem 2,5fachen Volumen absoluten Alkohols wurde der Überstand, der die freien Nukleotide enthält, mit 5%iger NaOH gegen Phenolphthalein neutralisiert. Die Nukleotide wurden dann durch Zugabe von 1,0ml 20%iger Bariumacetatlösung als Bariumsalze gefällt. Das Vorgehen entsprach im einzelnen dem von Umbreit, Burris und Stauffer angegebenen Verfahren (13). Bei wenigen Versuchen wurden zunächst die bariumfällbaren Di- und Triphosphatfraktionen sedimentiert und dann durch Zugabe des 5fachen Volumens Alkohol die Monophosphate gefällt. Beim überwiegenden Teil der Versuche wurde durch sofortige Alkoholzugabe die Gesamtnukleotidfraktion erfaßt. Nach Abzentrifugieren wurden die Bariumniederschläge in 4,0ml 1n HCl gelöst und das Barium mit 1/10n H_2SO_4 ausgefällt. Die im Überstand befindlichen Nukleotide wurden durch Ermittlung der Extinktionen bei 260m μ quantitativ bestimmt.

6. Analysemethoden

a. RNS - Bestimmung mit der Orcinmethode nach Maybaum

Lösung: 100mg $\text{FeCl}_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ in 100ml HCl (D 1,19) gelöst,
dazu 3,5ml einer 6%igen Orcinlösung in reinem
Alkohol.

0,2ml der wäßrigen RNS - Lösung wurden mit
1,0ml 6,6%iger Perchlorsäure gefällt, zentrifugiert und
einmal mit absolutem Alkohol nachgewaschen. Das Sediment
wurde in 1,0ml aqua dest. aufgenommen und mit 2,0ml
Orcin versetzt, in Reagenzgläser gefüllt und 15 Minuten
lang im Wasserbad bei 100°C gehalten, unmittelbar da-
nach mit Eiswasser abgekühlt, in 1cm OS - Küvetten um-
gefüllt und im PMQ II der Firma Zeiss bei $665\text{m}\mu$ gemes-
sen.

Herstellung der Eichkurve für RNS:

Mit Hefenukleinsäure, mit einer hochpolymeren
Leber - RNS (Serva) und mit einer äquimolaren Mischung
von Purin- und Pyrimidinnukleotiden wurden identisch
verlaufende Eichkurven erhalten. Aus ihnen wurde ein
Extinktionsfaktor von 92,5 ermittelt. Der RNS - Gehalt
in mg/Leber errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Extinktion} \cdot 92,5 \cdot \text{Gesamtvolumen}}{\text{Einsatzvolumen}} = \text{mg RNS/Leber}$$

b. DNS - Bestimmung mit der Diphenylaminmethode nach Dische

Lösung: 1g Diphenylamin in 100ml Eisessig gelöst,
dazu 2,5ml konzentrierte H_2SO_4

1,0ml der wäßrigen DNS - Lösung wurde mit
0,1ml 50%iger Perchlorsäure gefällt, zentrifugiert
und einmal mit absolutem Alkohol nachgewaschen.

Das Sediment wurde in 1,0ml aqua dest. aufgenommen und mit 2,0ml Dische - Reagens versetzt, in Reagenzgläser gefüllt, 15 Minuten lang im Wasserbad bei 100°C gehalten, unmittelbar danach in Eiswasser abgekühlt, in 1cm DS-Küvetten umgefüllt und im PMQ II der Firma Zeiss bei 595m μ gemessen.

Herstellung der Eichkurve für DNS:

Mit Hilfe eines Thymus- und eines Sperma-DNS-Präparates (Serva) und einer äquimolaren Mischung von Desoxypurin- und Desoxypyrimidinnukleotiden wurden identisch verlaufende Eichkurven erhalten. Aus ihnen wurde ein Extinktionsfaktor von 57,0 ermittelt. Der DNS - Gehalt in mg/Leber errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Extinktion} \cdot 57,0 \cdot \text{Gesamtvolumen}}{\text{Einsatzvolumen}} = \text{mg DNS/Leber}$$

c. Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäuren und der Nukleotide

0,1 - 0,5ml der Nukleinsäure- und Nukleotidlösungen wurden mit aqua dest. auf 3ml aufgefüllt und die Extinktionen bei 260m μ und 280m μ in einem PMQ II der Firma Zeiss in 1cm Quarzküvetten gemessen. Unter Verwendung eines hochpolymeren Nukleinsäurepräparates und freier Nukleotide wurden Spektren und Eichkurven angefertigt. Daraus wurde für die hochpolymere Nukleinsäure ein Extinktionsfaktor von 49,3/ml, für die hydrolysierten Nukleinsäuren und die freien Nukleotide ein Extinktionsfaktor von 41,7/ml errechnet.

d. Bestimmung der Radioaktivität

Bei dem überwiegenden Teil der Versuche wurde die Nukleinsäurefällung in 2,0ml Hyamin aufgenommen und bei Zimmertemperatur 30 bis 60 Minuten auf dem Magnetrührer gerührt.

Nach vollständiger Lösung erfolgte die Zugabe von 3,0ml Äthanol und 10,0ml Scintillator. (Scintillator: 6g PPO und 100mg Dimethylpopop in einem Liter Toluol) Diese Lösung wurde in kaliumarme 20,0ml fassende Glasbottles der Firma Nuklear Chicago gefüllt. Die Tritiumaktivität wurde in einem Flüssigkeitsscintillationszähler Mark I der Firma Nuklear Chicago gemessen. Die Diskriminatoreinstellungen der einzelnen Meßkanäle waren:

Kanal A = Tritiumkanal Fenster 0,5-9,9 Attenuator: 0,5
Kanal B = Ba 131 Kanal Fenster 0,5-9,9 Attenuator: 40
Kanal C = C^{14} Kanal Fenster 0,5-9,9 Attenuator: 54

Die Quenchkorrektur wurde mit Hilfe eines externen Barium-131-Standards unter gleichzeitiger Anwendung der Kanalverhältnismethode mittels einer Quenchkorrekturkurve bestimmt.

Für die Tritiummessungen wurde das Kanalverhältnis B/A des Bariumstandards auf der Abszisse gegen die prozentuale Erfassungsquote der Tritiumprobe (Kanal A) auf der Ordinate aufgetragen. Es wurde in einem Bereich zwischen 5% und 49% Effektivität eine nahezu lineare Beziehung erhalten, die eine Quenchkorrektur ohne Schwierigkeiten ermöglichte.

Für C^{14} wurde das Kanalverhältnis B/A des externen Standards gegen die in Kanal C gemessene prozentuale Erfassungsquote der C^{14} -Probe aufgetragen. Dabei wurde im Bereich stark gequenchter Proben zwischen 5% und 50% Effektivität eine ebenfalls annähernd linear verlaufende, gut auswertbare Kurve erhalten. Im Bereich gering gequenchter Proben war die Kurve stärker gekrümmt. Bei diesen Proben war eine Quenchkorrektur mit Hilfe des Kanalverhältnisses der Meßproben ohne Verwendung des externen Standards leichter durchführbar.

Diese Messungen wurden in einem Flüssigkeitsscintillationszähler (Modell 720 Liquid Scintillation Systems) der Firma Nuklear Chicago durchgeführt.

Einstellung der Kanäle:

Data HV Einstellung: 4/16 = 900 Volt

Gate HV Einstellung: 8/16 = 1200 Volt

Kanal 2

$L_3 = 0,5 - L_5 = 9,9$ Gesamtspektrum in Fenster $L_3 - L_5$

Kanal 3

$L_3 = 0,5 - L_4 = 2,0$

Niederenergetischer Anteil im Fenster $L_3 - L_4$

Aus dem Verhältnis von $\frac{\text{Kanal 3}}{\text{Kanal 2}}$

wurde mit Hilfe zunehmend quenchender Proben eine Quenchkurve ermittelt, die bis zu einer Ausbeute von 5% linear verlief.

7. Fehlerberechnung und statistische Beurteilung

Zur statistischen Beurteilung wurde die mittlere Abweichung der Einzelwerte δE und der Mittelwerte δM nach den Formeln:

$$\delta E = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n - 1}} \quad \delta M = \frac{\delta E}{\sqrt{n}} \quad \text{errechnet.}$$

Die statistische Signifikanz der Differenz zweier Kollektive wurde unter Zugrundelegung der T Verteilung beurteilt.

$$T = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\delta m_1^2 + \delta m_2^2}}$$

Die Größe von P wurde danach aus den Geigytafeln ermittelt.

C. Experimenteller Teil

I. Nukleinsäuregehalte und Nukleinsäuresynthese in der Leber unbehandelter Tiere

1. Physiologischer Variationsbereich der Nukleinsäuresynthese in der Leber

Die Nukleinsäuresynthese der Leber besitzt eine sehr große physiologische Variationsbreite. Von experimentellem Interesse sind vor allem ausgeprägte altersabhängige, ernährungsbedingte und tagesrhythmische Schwankungen.

Bei adolescenten Tieren bedingt der hohe Baustoffbedarf des wachsenden Gesamtorganismus eine hohe Syntheseleistung der Leber, die ihren Ausdruck in einer intensiven Neusynthese und in einem hohen Umsatz aller Nukleinsäuretypen findet. Ein stationärer Zustand wird erst bei einem Tiergewicht von ungefähr 30g erreicht. Bei diesem Gewicht ist nach biometrischen und histometrischen Analysen (Siess, Schaudé) das Leberwachstum abgeschlossen.

Auch bei adulten Tieren von über 30g Körpergewicht führen Diätumstellungen und besonders Futtergaben ad libitum nach vorausgegangener Nahrungseinschränkung oder vollständigem Nahrungsentzug zu einer Zunahme der relativen Lebergröße und damit verbunden zu einer Erhöhung der Nukleinsäuresynthese. Das ist methodisch von erheblicher Bedeutung. Bei frisch vom Züchter bezogenen Tieren, deren Nahrungsmenge limitiert war und die beim Transport zudem einer längeren Nahrungskarenz unterworfen waren, kommt es bei Futterzufuhr ad libitum in den ersten Tagen zu einer erheblichen Zunahme der Lebergröße. Die Einbauraten markierter Nukleinsäurevorstufen sind während dieser Phase stark erhöht.

Das zeigt Tabelle 1 am Beispiel des Einbaues von H^3 - Uracil in die Leber zweier annähernd gleichschwerer Tiere. Tier A wurde unmittelbar nach Eintreffen vom Züchter untersucht, Tier B nach einer längeren Eingewöhnungszeit und vollständiger Anpassung an die neuen Stall- und Ernährungsbedingungen.

Tabelle 1

		Tier A	Tier B
Fraktion			
Kerne 50°	DpM/g	6002	928
	DpM/L25	7400	1106
	DpM/mg RNS	4055	803
Kerne 65°	DpM/g	704	430
	DpM/L25	868	513
	DpM/mg RNS	2436	367
Mikros. 50°	DpM/g	2959	968
	DpM/L25	3648	1153
	DpM/mg RNS	453	186
Mikros. 65°	DpM/g	763	363
	DpM/L25	940	433
	DpM/mg RNS	4712	442
Plasma	DpM/g	1221	719
	DpM/L25	1506	857
	DpM/mg RNS	749	874

Tabelle 1 zeigt die Beeinflussung der RNS - Synthese in der Leber durch die Veränderung von Ernährungs- und Stallbedingungen. Tier A: Analyse während der ersten Tage der Ernährungsumstellung, Tier B: Untersuchung nach mehrwöchiger Adaptation.

Bezugsgrößen: DpM/g = DpM pro g Frischgewicht Leber.
DpM/L25 = DpM pro Gesamtleber unter Zugrundelegung des relativen Lebergewichtes eines 25g schweren Tieres.

Der Nukleinsäureumsatz der Leber zeigt, wie die meisten Stoffwechselvorgänge, deutliche tagesrhythmische Schwankungen, die möglicherweise durch den bei Mäusen sehr ausgeprägten Rhythmus der Nahrungsaufnahme hervorgerufen sind. Eingehende Untersuchungen über den tagesperiodischen Verlauf der Nukleinsäuresynthese wurden in autoradiographischen Analysen von Peter, Schaudé und anderen durchgeführt. Sie fanden, daß das Maximum der Syntheserate in den frühen Morgenstunden liegt; es folgt dann ein kontinuierlicher Abfall mit Tiefstwerten in den Mittagsstunden und ein Wiederanstieg am späten Abend. Bei unseren Untersuchungen stützten wir uns auf die Resultate dieser Autoren. Zur Bestimmung der Inkorporationsrate markierter Vorstufen in RNS und DNS wurde bei allen Experimenten morgens um 8⁰⁰ das markierte Material intraperitoneal verabfolgt. Um die oben erwähnten Schwankungen weitgehend auszuschalten, wurden für die Untersuchungen nur annähernd gleichschwere und gleichgeschlechtliche Tiere verwandt, die durch etwa vierzehntägige Adaptation an die Ernährungs- und Stallbedingungen der Versuchszeit angepaßt waren.

2. Abhängigkeit der Nukleinsäuremarkierung von der Einwirkungsdauer der markierten Vorstufen

Die Markierung der differenten Nukleinsäurefraktionen zeigt bei der Pulsmarkierung eine deutliche Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer der markierten Vorstufen. Das wurde von Scherrer und Darnell an Kulturen von Helazellen gezeigt; die hier beobachtete Gesetzmäßigkeit fanden Bush, Georgiev und andere auch in der Leber bei Applikation markierter Vorstufen in vivo. Bei einer Einwirkungsdauer von wenigen Minuten findet sich die Markierung zunächst in sehr hochmolekularen Fraktionen mit Sedimentationswerten von über 27 S.

Die Aktivitätsmaxima verschieben sich dann in den niedermolekularen Bereich und fallen nach etwa ein bis zwei Stunden mit den Gipfeln der ribosomalen und der Transfer-RNS zusammen. Die Inkorporationsrate in die einzelnen Georgievfraktionen verhält sich analog. Das wird in Tabelle 2 am Beispiel der Inkorporation von H^3 - Orotsäure in die RNS dargestellt.

Tabelle 2

Zeit in Min.	Einbauraten in DpM/g FG				Einbauraten in DpM/mg RNS			
	30	60	90	120	30	60	90	120
Fraktion								
Kerne 50°	4545	9795	4679	6226	4370	9069	4587	6044
65 $^{\circ}$	482	320	215	380	2707	2758	1679	3392
Summe K	5027	10115	4894	6606	7707	11827	6266	9436
Mikros.	1409	5195	4027	7497	828	2624	2142	4019
Plasma	767	1687	1383	1474	434	1104	920	1126

Zu Tabelle 2: Einbau von H^3 - Orotsäure in die Nukleinsäuren der Leber bei verschieden langer Einwirkungszeit.

Etwa eine Stunde nach intraperitonealer Injektion der Orotsäure sind alle Fraktionen markiert. Sie erreichen zu diesem Zeitpunkt meist ein Maximum, das bei weiterer Einwirkungsdauer nicht überschritten wird.

3. Abhängigkeit der Inkorporationsrate von den angewandten Nukleinsäurevorstufen

Die absolute Größe der in die Nukleinsäurefraktionen inkorporierten Aktivität ist in erheblichem Maße abhängig von der Art der angebotenen markierten Vorstufen.

Tabelle 3 gibt die Abhängigkeit der Inkorporationsrate von der Art der angebotenen Vorstufen wieder.

Tabelle 3

		Uridin	Orotsäure	Uracil
Fraktionen				
Kerne 50 ⁰	DpM/g	59168	2775	1000
	DpM/mg RNS	16987	1026	1130
Kerne 65 ⁰	DpM/g	4234	882	407
	DpM/mg RNS	3680	966	810
Mikros. 50 ⁰	DpM/g	45172	3130	975
	DpM/mg RNS	7607	404	248
Mikros. 65 ⁰	DpM/g	4732	576	313
	DpM/mg RNS	3138	670	331
Plasma	DpM/g	9000	1343	896
	DpM/mg RNS	3502	1209	875

Die höchsten Einbauraten finden sich nach Applikation des Nukleotids Uridin, etwas geringere, aber ebenfalls sehr hohe Inkorporationsraten wurden beim Angebot markierter Orotsäure gefunden. Uracil wurde weniger stark, aber in noch gut meßbarem Ausmaß inkorporiert. Der geringere Einbau von Uracil mag dadurch bedingt sein, daß diese Basen nicht im direkten Weg der Nukleinsäuresynthese liegt. Da aus vorausgegangenen Untersuchungen anzunehmen war, daß bei der pharmakainduzierten Lebervergrößerung die Schritte der Ribotidbildung und des reduktiven Uracilabbaues primär beeinflusst werden, haben wir trotz der niedrigeren Einbauraten den größten Teil der Untersuchungen mit Uracil-5-H³ und Orotsäure-5-H³ durchgeführt.

4. Mittlere RNS - Gehalte und mittlere Inkorporations-
raten von H^3 - Uracil in der Leber unbehandelter Tiere

In der Leber unbehandelter Tiere wurden übereinstimmend mit früheren Untersuchungen (Räker, Bosch) insgesamt 8 bis 10mg RNS pro Gramm Frischgewicht Leber gefunden. Die Verteilung auf die einzelnen Zell- und Georgievfraktionen ist in Tabelle 5 in Absolutwerten dargestellt; zur besseren Vergleichbarkeit gibt Tabelle 4 die prozentualen RNS - Gehalte der einzelnen Fraktionen, bezogen auf den Gesamt - RNS - Gehalt der Zelle an.

Tabelle 4

Fraktionen	Prozentuale Verteilung	
	der Gehalte	der Einbauraten
	mg/g	DpM/g DpM/mg RNS
Kerne 50°	9,7%	28,1% 40,6%
65°	5,9%	12,8% 23,4%
Summe K	15,6%	40,9% 64,0%
Mikros. 50°	58,3%	29,5% 6,2%
65°	13,2%	10,4% 9,3%
Summe M	71,5%	39,9% 15,5%
Plasma	12,9%	19,2% 21,5%

Tabelle 4: Prozentuale Verteilung der Nukleinsäuregehalte und der Inkorporationsraten von H^3 - Uracil in den Zell- und Georgievfraktionen der Leber unbehandelter Tiere. Gesamt - RNS und Gesamtaktivität von 1g Leber gleich 100%.

Danach finden sich ungefähr 70% der Zell - RNS in den Mikrosomenfraktionen und je etwa 15% in den Kern- und Zytoplasmafraktionen.

Tabelle 5

Mittelwerte der Zellfraktionen und der Georgievfraktionen
unbehandelter Tiere. (17 Tiere)

Fraktionen	RNS - Gehalte			Einbausraten von H^3 - Uracil			
	<u>mg/g</u>	<u>$\pm \delta_m$</u>	<u>mg/L25</u>	<u>$\pm \delta_m$</u>	<u>DpM/L25</u>	<u>$\pm \delta_m$</u>	<u>DpM/mgRNS $\pm \delta_m$</u>
Kerne							
50°	0,7596	0,0844	0,9612	0,1037			
65°	<u>0,4548</u>	<u>0,0826</u>	<u>0,5677</u>	<u>0,0973</u>	1612	129	1942
					724	68	1120
S - Kerne	1,2144		1,5289		2336		3062
Mikrosomen							
50°	4,4935	0,2352	5,6777	0,0900			
65°	<u>1,0181</u>	<u>0,1379</u>	<u>1,2738</u>	<u>0,1653</u>	1683	207	298
					577	67	442
g - Mikr.	5,5116		6,9515		2260		740
Plasma							
65°	0,9744	0,0889	1,2308	0,1077	1091	102	966
Summe aller							
Gehalte	7,7004		9,7112				4768
					5687		

Bei allen Zellfraktionen ist der überwiegende Anteil der RNS schon bei 50°C extrahierbar, besteht also aus Transfer- und ribosomaler RNS. Der Anteil der schwerlöslichen RNS, die nach Georgiev überwiegend aus m-RNS besteht, ist wesentlich geringer. Der bei 65°C extrahierbare Anteil beträgt etwa ein Fünftel der Gesamt-RNS.

Die Markierung der Zell- und Georgievfraktionen des gleichen Tierkollektivs nach einstündiger Einwirkung von H^3 - Uracil zeigt ein von den Nukleinsäuregehalten abweichendes Verteilungsbild. Bei Bezug auf das Lebergewicht besitzt die Kernfraktion, die nur etwa 15% der Gesamtnukleinsäuren enthält, eine höhere Inkorporationsrate als die annähernd 72% der Nukleinsäuren enthaltende Mikrosomenfraktion. Die Markierung der Zytoplasmafraktion ist mit etwa 20% Gesamtaktivität geringer als die der Kern- und Mikrosomenfraktion; liegt jedoch wesentlich höher, als es ihrem prozentualen Gehaltsanteil entspricht. Die höchste absolute Aktivität ist in den 50°-Fraktionen der Kerne mit 28,1% und der Mikrosomen mit 29,5% in etwa gleichem Ausmaß zu finden. Die Inkorporation in die 65°-Fraktionen ist in beiden Zellräumen wesentlich geringer. Die Kernfraktion enthält hier 12,8%, die Mikrosomenfraktion 10,4% der Gesamtaktivität.

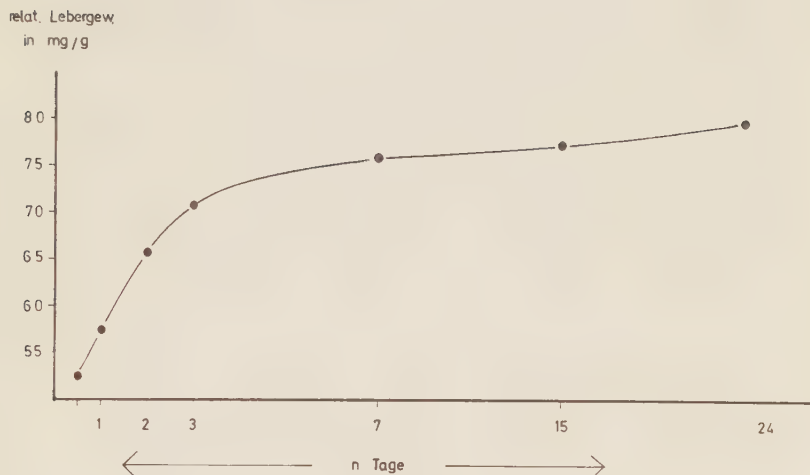
Durch die sehr unterschiedlichen Nukleinsäuregehalte der einzelnen Zellfraktionen ergibt sich ein wesentlich anderes Bild von den spezifischen Aktivitäten. Hier finden sich bei weitem die höchsten Werte in beiden Kernfraktionen. Die spezifischen Aktivitäten der leicht- und der schwerlöslichen Kern - RNS liegen um ein mehrfaches höher als die der entsprechenden Mikrosomenfraktionen. Die spezifische Aktivität der Mikrosomenfraktionen liegt mit 298 DpM bzw. 442 DpM/mg RNS noch unter der der Zytoplasmafraktion mit 966 DpM/mg RNS. Es muß allerdings offen bleiben, ob die Angaben der spezifischen Aktivität hier einen realen Maßstab zum Vergleich der Syntheseaktivität darstellen. Die mikrosomale RNS besteht zu einem sehr hohen Teil aus präformierten ribosomalen Anteilen, die an keinem turnover mehr teilnehmen.

II. Nukleinsäuregehalte und Nukleinsäuresynthese in der Leber phenobarbitalbehandelter Tiere

1. Verlauf der Lebervergrößerung unter der Ein- wirkung von Phenobarbital

Phenobarbital wurde wie in früheren Untersuchungen 0,1%ig ad libitum mit dem Trinkwasser gegeben. Die täglich aufgenommene Dosis wurde durch Rückwiegen der täglichen Trinkwassermenge ermittelt. Unter diesen Bedingungen nehmen die Tiere sehr konstant 150ml pro kg Tiergewicht auf; die während des Tages aufgenommene Phenobarbitalmenge beträgt demnach 150mg pro kg. Das Lebergewicht der Tiere beginnt unter dieser Behandlung nach 24 Stunden anzusteigen und erreicht nach einem steilen Anstieg während der nächsten drei Tage etwa am 6. bis 7. Tag ein Maximum, das bei chronischer Weiterfütterung beibehalten wird. Der Anstieg des Lebergewichtes war zu keinem Zeitpunkt durch Zellödeme bedingt. Die Proteingehalte der Leber stiegen dem Organgewicht streng parallellaufend an. In der Abbildung 1 wird der bei unseren Versuchen ermittelte Verlauf der Wachstumskurve dargestellt. Die einzelnen Meßpunkte stellen Mittelwerte der relativen Lebergewichte des zu diesem Zeitpunkt untersuchten Gesamtkollektivs dar.

Abbildung 1



Zu Abbildung 1: Verlauf des relativen Lebergewichtes bei chronischer Zufuhr von Phenobarbital mit dem Trinkwasser. Mittlere Tagesgesamtdosis 150mg pro kg Tiergewicht. Relatives Lebergewicht gleich mg Lebergewicht/g Tiergewicht.

2. Beeinflussung der Nukleinsäuregehalte der Leber durch Phenobarbital

Aufgrund des Verlaufs der Wachstumskurve wurden die Untersuchungen über die Nukleinsäuresynthese zunächst im steilen Schenkel des Gewichtsanstieges zwischen dem ersten und dritten Tag durchgeführt. Um ein größeres, für die statistische Beurteilung ausreichendes Kollektiv zu erhalten, wurden die Werte der ersten drei Tage ohne nähere zeitliche Differenzierung zusammengefaßt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Die Tabelle zeigt in den ersten beiden Spalten die Beeinflussung der Nukleinsäuregehalte der einzelnen Zell- und Georgievfraktionen. Es werden die Nukleinsäurekonzentrationen, bezogen auf ein Gramm Leber und die Nukleinsäuregesamtgehalte der ganzen Leber angegeben. Um hier vergleichbare Größen zu erhalten, wurden die Gesamtgehalte unter Zugrundelegung des gemessenen relativen Lebergewichtes für die Leber eines Standardtieres von 25g Körpergewicht berechnet. Da zwischen Körpergewicht und relativem Lebergewicht eine lineare Beziehung besteht, ist dieses Vorgehen berechtigt. (Dissertation Räker 1965)

Zur Errechnung der prozentualen Veränderungen und zu ihrer statistischen Sicherung wurden die in Tabelle 5 angegebenen Mittelwerte unbehandelter Tiere herangezogen.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß unter der Einwirkung von Phenobarbital die RNS - Konzentration der Leber annähernd unverändert bleibt. Bei den unbehandelten Tieren wurde ein mittlerer RNS - Gehalt von 7,7mg/g Leber, bei den phenobarbitalbehandelten Tieren ein mittlerer RNS - Gehalt von 7,72mg/g Leber gefunden.

Tabelle 6 Mittelwerte der Zellfraktionen und der Georgievfraktionen
der mit Phenobarbital behandelten Tiere. (Erläuterungen im Text)

		RNS - Gehalte			Einbausraten von H^3 - Uracil						
Fraktionen		mg/g	$\pm \delta$ m	mg/L25	$\pm \delta$ m	DpM/g	$\pm \delta$ m	DpM/L25	$\pm \delta$ m	DpM/mgRNS	$\pm \delta$ m
Kerne											
50°		0,4988	0,027	0,7755	0,051	2803	226	4272	364	6572	1447
$\Delta\%$		- 34,3		- 19,3		+ 123,5		+ 165		+ 238,4	
P		< 0,005		< 0,1		< 0,001		< 0,001		< 0,005	
65°											
50°		0,2506	0,030	0,3997	0,060	760	105	1129	162	4792	870
$\Delta\%$		- 44,9		- 29,6		+ 32,6		+ 55,9		+ 327,8	
P		< 0,025		< 0,1		< 0,075		< 0,025		< 0,001	
S - Kerne		0,7494		1,1752		3563		5401		11364	
S - %		- 38,3		- 23,2		+ 98,9		+ 131,2		+ 271,1	
Mikrosomen											
50°		4,7498	0,19	7,2149	0,25	3803	560	5630	804	820	117
$\Delta\%$		+ 5,7		+ 27		+ 189,2		+ 234,5		+ 175	
P		< 0,40		< 0,075		< 0,001		< 0,001		< 0,001	
65°											
50°		1,3646	0,112	2,0660	0,161	982	155	1432	217	720	96
$\Delta\%$		+ 34		+ 62,2		+ 112,5		+ 148,7		+ 62,9	
P		< 0,075		< 0,0025		< 0,005		< 0,001		< 0,02	
γ - Mikr.		6,1144		9,2809		4785		7065		1540	
S - %		+ 10,9		+ 33,5		+ 169,3		+ 212,6		+ 108,1	
Plasma											
50°		0,8546	0,037	1,3125	0,062	2345	500	3405	697	2521	454
$\Delta\%$		- 12,3		+ 6,6		+ 174,2		+ 212		+ 161	
P		< 0,20		< 0,50		< 0,005		< 0,0025		< 0,0025	

Der Nukleinsäuregesamtgehalt der Leber steigt demnach der Lebervergrößerung entsprechend an. Es zeigen sich dabei jedoch deutliche intrazelluläre Verschiebungen. Während die Nukleinsäuregehalte der Kernfraktionen abnehmen, steigen die Gehalte der Mikrosomenfraktionen an. Diese Verschiebung vom Kern- in den Plasmaraum zeigt besonders deutlich die 65° - Fraktion. Der Gehalt der 65° - Fraktion der Kerne sinkt um 45%, der der Mikrosomenfraktion steigt um 35% an.

3. Beeinflussung des Einbaues von H^3 - Uracil in die Nukleinsäuren

Als Maß der Nukleinsäuresynthese wurde der Einbau von H^3 - Uracil unter den gleichen Bedingungen wie bei den Kontrolltieren untersucht. Um die einleitend erwähnten Schwankungen der Nukleinsäuresynthese weitgehend auszuschließen, wurden die phenobarbitalbehandelten Tiere mit gleichalten und annähernd gleichschweren Kontrolltieren in einer Versuchesserie am gleichen Tage untersucht. Im 2. Abschnitt der Tabelle 6 sind die unter diesen Bedingungen gefundenen Einbauraten angegeben, die bei dem gleichen Tierkollektiv gefunden wurden, dessen Nukleinsäuregehalte der erste Teil der Tabelle wiedergibt. Auch hier sind die prozentualen Veränderungen der absoluten Größen sowie die Werte für P auf das in Tabelle 5 zusammengestellte Kontrollkollektiv bezogen. Der absolute Einbau von H^3 - Uracil in die Leber phenobarbitalbehandelter Tiere ist mit einer Steigerung von 140% statistisch sicher erhöht. Da die Erhöhung der RNS - Synthese in den ersten Tagen zwangsläufig die Zunahme der RNS - Gehalte übersteigt, ist die spezifische Aktivität der Leber - RNS sogar um 225% gesteigert.

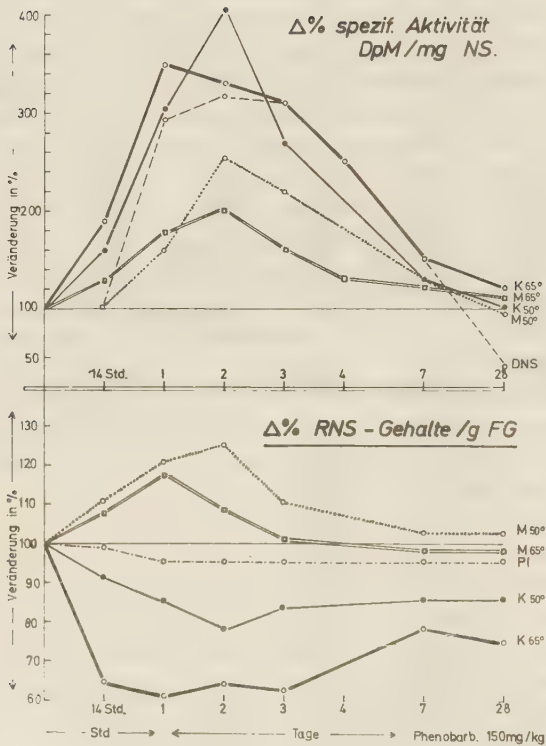
An der Erhöhung der Einbauraten sind die Nukleinsäuren aller Zellanteile und aller Georgievfraktionen beteiligt. Das Ausmaß der Synthesesteigerungen in den einzelnen Fraktionen zeigt dabei charakteristische Unterschiede. Die höchste absolute Zunahme der Inkorporationsrate zeigt die Mikrosomenfraktion und die zytoplasmatische RNS. In der wachsenden Leber der phenobarbitalbehandelten Tiere findet sich die höchste Aktivität überhaupt in der Mikrosomenfraktion. Die Verteilung auf die Georgievfraktionen ist in beiden Zellräumen qualitativ gleich. Die höchste Aktivität findet sich in den 50^0 - Fraktionen. Die spezifischen Aktivitäten ergeben durch die in der phenobarbitalbehandelten Leber stattfindende Verschiebung der RNS - Gehalte vom Kern- in den Plasmaraum ein wesentlich anderes Bild. Hier zeigen beide Kernfraktionen die weitaus größten Steigerungen. Die spezifische Aktivität der 65^0 - Fraktion weist mit einer Erhöhung von über 300%, in Einzelfällen bis zu 700% auf eine intensive Neubildung schwerlöslicher RNS hin. Auch die spezifische Aktivität der 50^0 - Fraktion der Kerne liegt mit einer Steigerung von 250% wesentlich über der Zunahme der entsprechenden Mikrosomenfraktion. Die spezifische Markierung der schwerlöslichen Fraktion der Mikrosomen ist deutlich geringer, aber ebenfalls noch statistisch sicher erhöht. Auch die lösliche RNS der Zytoplasmافرaktion zeigt eine signifikante Erhöhung der spezifischen Aktivität, die hier jedoch deutlich unter der der anderen Fraktionen liegt.

4. Beeinflussung von Gehalt und Syntheserate von RNS im Verlauf chronischer Phenobarbitaleinwirkung

Die im vorausgegangenen Abschnitt aufgeführten Tabellen geben die Beeinflussung der Nukleinsäuresynthese wieder, die ohne Berücksichtigung der genauen Dauer der Phenobarbitaleinwirkung während der gesamten schnellen Wachstumsphase der Leber beobachtet wurde. Von großer Wichtigkeit für die Deutung des Phänomens der Lebervergrößerung waren detaillierte Untersuchungen über den zeitlichen Verlauf der Synthesesteigerung der einzelnen Nukleinsäurefraktionen. Es interessierte einmal, wann und bei welchem Nukleinsäuretyp die Syntheseerhöhung einsetzt. Für die Frage der toxikologischen Bedeutung war es außerdem wichtig, den Nukleinsäureumsatz in der vergrößerten Leber nach Abschluß der Wachstumsphase zu untersuchen. Die Resultate dieser Versuchsreihe sind im einzelnen in den Anhangstabellen V bis VIII zusammengestellt. Zur besseren Übersicht werden hier die Ergebnisse in einem Diagramm dargestellt. (Abbildung 3)

Im unteren Teil der Abbildung sind die Veränderungen der RNS - Gehalte pro g Frischgewicht Leber in Prozenten der bei unbehandelten Kontrollen gefundenen Größen angegeben. Die obere Hälfte des Diagramms zeigt die beim gleichen Kollektiv gefundenen Verläufe der spezifischen Aktivität als prozentuale Differenz. Schon 14 Stunden nach Beginn der Phenobarbitalzufuhr setzten die im vorausgegangenen Abschnitt nach 1 bis 3 Tagen Einwirkungszeit gefundenen Veränderungen ein. Die schwerlösliche RNS - Fraktion der Kerne sinkt steil ab und erreicht nach 14 Stunden ihr tiefstes Niveau, das auch in den nächsten Tagen beibehalten wird. Die spezifische Aktivität dieser Fraktion zeigt einen annähernd reziproken Verlauf.

Abbildung 3



Der Einbau von H^3 - Uracil ist nach 14 Stunden um fast 200% erhöht und erreicht nach 24 Stunden eine maximale Steigerung von über 300%. Auch hier wird die maximale Veränderung während der nächsten Tage beibehalten, um sich erst nach Abschluß der Vergrößerungsperiode wieder langsam dem Normbereich zu nähern.

Gleichgerichtet, jedoch weniger ausgeprägt sind die Veränderungen der 50^0 - Fraktion der Kerne. Die Gehalte sinken gleichfalls nach 14 Stunden ab und erreichen Tiefstwerte zwischen dem 1. und 3. Tage; die spezifische Aktivität verläuft wie bei der 65^0 - Fraktion reziprok.

Die RNS - Gehalte beider Mikrosomenfraktionen steigen den Kernfraktionen umgekehrt proportional verlaufend an. Die spezifischen Aktivitäten dieser Fraktionen sind ebenfalls erhöht, erreichen jedoch zu keinem Zeitpunkt die spezifische Aktivität der Kernfraktionen. Die Konzentration der zytoplasmatischen RNS bleibt während des ganzen Verlaufs der Lebervergrößerung unverändert. Die spezifische Aktivität steigt wiederum in den ersten Tagen an und erreicht ihren Gipfel am 3. Tage. Die Aktivität liegt aber immer unter der der anderen Fraktionen.

Nach Abschluß der Wachstumsphase liegen in der vergrößerten Leber, etwa vom 7. Tage ab, die RNS - Gehalte und die spezifischen Aktivitäten wieder im Normbereich; allein die RNS - Gehalte der Kerne sind noch gering erniedrigt. Dies dürfte ein Äquivalent der histometrisch nachgewiesenen Verschiebung der Kern - Plasma - Relation in der vergrößerten Leber sein; das Kernvolumen bleibt in gleicher Größenordnung hinter dem Plasmavolumen zurück. (Siess)

5. Die Beeinflussung der Inkorporationsrate von H^3 - Uridin

Uridin wird, wie bereits erwähnt, sehr viel stärker in alle RNS - Fraktionen eingebaut als Uracil. Auch in der phenobarbitalbehandelten Leber lag die Inkorporationsrate in etwa gleichem Ausmaß über der von Uracil. In der Phase des Leberwachstums, nach eintägiger Phenobarbitaleinwirkung, war der Uridineinbau zwar etwas geringer gesteigert als der Uracileinbau; wegen der wenigen Uridinversuche war diese Differenz jedoch nicht zu sichern. Sie läßt deshalb keine Schlüsse auf Wirkungsmechanismen zu.

Nach Abschluß des Wachstums in der vergrößerten Leber war auch beim Uridin keine erhöhte Inkorporation mehr nachweisbar, die Inkorporationsrate war eher erniedrigt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 7 und in den Anhangstabellen IX und X zusammengestellt.

Tabelle 7

Einbaurrate von H^3 - Uridin

Fraktionen		Kontrolle	1 Tag Phenobarb.	7 Tage Phenobarb.
Kerne	DpM/g	75242	114927 = + 53%	45099 = - 40%
	50° DpM/L25	94398	164887 = + 75%	75012 = - 21%
	DpM/mgRNS	38443	84742 = + 120%	23946 = - 38%
65°	DpM/g	6972	10365 = + 49%	2632 = - 62%
	DpM/L25	8749	14859 = + 70%	4416 = - 50%
	DpM/mgRNS	9866	39906 = + 304%	10711 = + 6%
Summe	DpM/g	82214	125292 = + 52%	47731 = - 42%
Kerne	DpM/L25	103147	179764 = + 74%	79428 = - 24%
	DpM/mgRNS	48309	124648 = + 158%	34657 = - 28%
Mikro.	DpM/g	46212	49901 = + 8%	22195 = - 52%
50°	DpM/L25	57726	71208 = + 23%	38069 = - 34%
	DpM/mgRNS	7380	8492 = + 15%	4773 = - 35%
65°	DpM/g	4261	5758 = + 35%	2990 = - 30%
	DpM/L25	5307	8224 = + 55%	4871 = - 8%
	DpM/mgRNS	3908	8511 = + 118%	1845 = - 53%
Summe	DpM/g	50473	55659 = + 10%	25185 = - 51%
Mikro.	DpM/L25	63033	79432 = + 26%	42940 = - 32%
	DpM/mgRNS	11288	17003 = + 50%	6618 = - 42%
Plasma				
	DpM/g	9726	14442 = + 48%	7621 = - 22%
	DpM/L25	12163	20367 = + 67%	12381 = + 1%
	DpM/mgRNS	4182	7512 = + 80%	3729 = - 11%

Tabelle 7: Mittlere Einbaurrate von H^3 - Uridin in die Geor-
giefvfraktionen von unbehandelten und mit Phenobarbital be-
handelten Tieren. Dauer der Phenobarbitalbehandlung 1 Tag
und 7 Tage. Phenabarbitalgabe 150mg/kg pro Tag. Größenan-
gabe in DpM/g, DpM/L25 und in DpM/mgRNS.

6. Die Beeinflussung der Inkorporationsrate von

H³ - Orotsäure

Für unsere Fragestellung war die Beobachtung der Inkorporation von Orotsäure von besonderem Interesse, da diese Vorstufe im Gegensatz zum Uracil auf dem direkten Wege der RNS - Biosynthese liegt, jedoch zum Unterschied von Uridin noch den Schritt der Ribosidierung einschließt. Außerdem ermöglicht die Anwendung von Orotsäure die gleichzeitige Beobachtung der RNS - und DNS - Synthese. In Tabelle 8 und in den Anhangstabellen IX und XI sind die Ergebnisse dieser Versuche zusammengestellt. Es zeigen sich im Prinzip die gleichen Veränderungen der Einbauraten wie bei den schon untersuchten Vorstufen.

Tabelle 8

Einbauraten von H³ - Orotsäure

		Kontrolle	14 Std. Phenob.	24 Tage Phenob.
Kerne	DpM/g	6580	9483 = + 44%	5487 = - 17%
	DpM/L25	9475	13031 = + 37%	10683 = + 12%
	DpM/mgRNS	4635	7725 = + 66%	12193 = +163%
Mikros.	DpM/g	4635	5538 = + 19%	4618 = - 1%
	DpM/L25	6674	7607 = + 14%	8993 = + 34%
	DpM/mgRNS	617	738 = + 19%	988 = + 40%
Plasma	DpM/g	1533	1861 = + 20%	1327 = - 15%
	DpM/L25	2208	2548 = + 15%	2573 = + 16%
	DpM/mgRNS	835	1005 = + 20%	1464 = + 75%

Tabelle 8: Mittlere Einbauraten von H³ - Orotsäure in die Georgievfraktionen von unbehandelten und mit Pheno-
barbital behandelten Tieren. Phenobarbitalbehandlung
14 Stunden und 24 Tage. Phenobarbitalgabe 150mg/kg/Tag.
Größenangabe in DpM/g, DpM/L25 und in DpM/mgRNS.

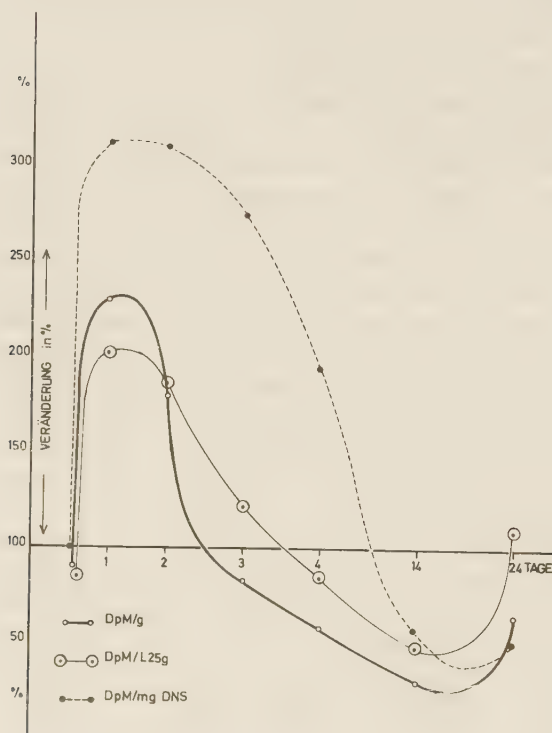
III. DNS - Synthese in der Leber unbehandelter Tiere und Beeinflussung der DNS - Synthese durch Phenobar- bitalbehandlung

Von besonderem Interesse für die Beurteilung der toxikologischen Bedeutung der pharmakainduzierten Lebervergrößerung waren Untersuchungen über das Verhalten des DNS - turnover während der Wachstumsphase in der vergrößerten Leber.

In der Leber unbehandelter Tiere läßt sich als Äquivalent des Zellumsatzes ein ziemlich konstanter Einbau von H^3 - Thymin nachweisen. Gleiche Abhängigkeiten vom Tiermaterial und vom Untersuchungszeitpunkt, wie sie bei der Besprechung der RNS - Synthese näher abgehandelt wurden, bestehen auch hier. So findet sich sinngemäß eine erhöhte DNS - Synthese in der Leber junger, noch wachsender Tiere, wie auch in der wachsenden Leber nach Wiederfütterung bei Nahrungsentzug und ebenso auch bei der Anpassung an eine Nahrungsumstellung. Die Abhängigkeit von dem Tagesrhythmus ist bei der DNS - Synthese noch wesentlich ausgeprägter als bei der RNS - Synthese. Es findet sich ein scharf umrissenes Maximum in den frühen Morgenstunden. Die der Synthesephase folgende Mitosewelle fällt in die Mittagsstunden zwischen 12⁰⁰ und 14⁰⁰. Durch Einhaltung streng vergleichbarer Untersuchungsbedingungen und durch die gleichzeitige Untersuchung von Kontroll- und Phenobarbitaltieren wurde der Einfluß dieser Umweltfaktoren weitgehend ausgeschaltet. In den Anhangstabellen XII bis XIV sind die Ergebnisse der DNS - Analysen zusammengestellt.

Bei Versuchen, in denen H^3 - Thymin und H^3 - Drotsäure als DNS - Vorstufen angeboten wurden, zeigte sich übereinstimmend, daß auch die DNS - Synthese in der phenobarbitalbehandelten Leber schon frühzeitig stimuliert wird. Sie folgt jedoch sicher der Steigerung der RNS - Synthese nach. Nach 14 Stunden, bei schon deutlich erhöhter Markierung der RNS, ist die Inkorporationsrate in der DNS noch unverändert.

Abbildung 4



Die ersten statistisch sicher erhöhten Werte finden sich nach 24 Stunden mit einer Steigerung von 300%; die Steigerung hält während der nächsten Tage an und fällt gegen Abschluß der Wachstumsphase steil zum Normbereich ab. In der vergrößerten Leber ist die DNS - Synthese mit Sicherheit erniedrigt. Sie beträgt am 28. Tag nur mehr 50% der normalen Leber. Der Zellumsatz in der vergrößerten Leber ist demnach nach Abschluß der Wachstumsphase nicht erhöht, sondern scheint sogar verlangsamt zu sein.

D. Diskussion

Wie einleitend näher ausgeführt wurde, sind bei der pharmakainduzierten Lebervergrößerung im wesentlichen zwei kausale Prinzipien zu diskutieren. Es ist einmal denkbar, daß es durch direkte Induktionsmechanismen zur Vermehrung der am Fremdstoffabbau beteiligten Enzymkomplexe kommt und daß für die Neusynthese, Strukturerhaltung und die gesteigerte Funktion dieser primär aktivierten Systeme sekundär eine Neubildung umfangreicher mitochondrialer und zytoplasmatischer Enzymgruppen induziert wird, die zum Syntheseapparat der Zelle gehören. Die Lebervergrößerung wäre demnach das Äquivalent einer funktionellen Hypertrophie spezieller Zellanteile.

Als zweites Wirkungsprinzip ist zu diskutieren, daß die Lebervergrößerung auf echtem, proportionierten Organwachstum beruht, das durch primären Eingriff der Pharmaka, ihrer Metabolite oder der Metabolisierungsreaktionen in den generativen Zellstoffwechsel erfolgt.

Da beide Wirkungsprinzipien nach unseren derzeitigen Kenntnissen ihre Ausprägung in einer unterschiedlichen Synthesesteigerung der einzelnen Nukleinsäuretypen finden müßten, wurden in der vorliegenden Untersuchung eingehende Analysen des Nukleinsäurestoffwechsels durchgeführt.

Die Untersuchungen haben bei der Reduktion auf das Wesentliche folgende Ergebnisse gebracht:

1. Bei chronischer Applikation lebervergrößernder Phenobarbitaldosen (150mg/kg/Tag) kommt es zu einer Abnahme der RNS - Gehalte des Kernes und zur annähernd umgekehrt proportionalen Zunahme der RNS - Gehalte des Extranuklearraumes. Die Verschiebung findet sich in etwa gleichem Maße bei den nach Georgiev gewonnenen 50⁰ - und 65⁰ - Fraktionen.

Die Abnahme der Kern - RNS - Gehalte setzt schon etwa 12 Stunden nach Beginn der Phenobarbitalzufuhr ein, erreicht zwischen dem 1. und 3. Tag ihr Maximum, und nähert sich in der vergrößerten Leber in der Folgezeit zunehmend der Norm.

2. Der Abnahme der RNS - Gehalte annähernd reziprok verlaufend kommt es zu einer intensiven Steigerung der Inkorporationsrate von Uracil, Orotsäure und Uridin in beide RNS - Fraktionen des Kerns. Die Erhöhung der Einbauraten ist sowohl beim Bezug auf ein Gramm Lebergewicht als auch bei Berücksichtigung der spezifischen Aktivitäten der extrahierten RNS hochsignifikant. Auch im Extranuklearraum ist eine statistisch sichere Steigerung der Inkorporation von RNS - Vorstufen in beide Georgievfraktionen nachweisbar. Der Syntheseanstieg folgt zeitlich dem der Kern - RNS nach und ist quantitativ geringer. In der vergrößerten Leber liegen die Inkorporationsraten wieder annähernd im Normbereich.

3. Der Steigerung der RNS - Synthese zeitlich nur wenig nachfolgend setzt eine Erhöhung der DNS - Synthese bis zu 300% ein. Nach Abschluß der Wachstumsphase ist die DNS - Synthese erniedrigt.

Zu 1: Die schon wenige Stunden nach Beginn der Phenobarbitalbehandlung einsetzende Abnahme der RNS - Gehalte der Kernfraktionen ist aufgrund unserer derzeitigen Kenntnisse nicht sicher zu deuten. Es war zunächst daran zu denken, daß die beobachtete Verschiebung von RNS aus dem Kern in den Extranuklearraum auf methodische Gründe zurückzuführen ist. Auch bei sehr schonender Zellfraktionierung werden nur etwa 60 bis 70% intakter Kerne erhalten; die restlichen Kerne werden bei der Präparation zerstört und bei der nachfolgenden Mitochondrien- und Mikrosomenfraktionierung miterfaßt. Es war denkbar, daß unter der Einwirkung von Phenobarbital eine erhöhte Labilität der Kernmembran eintritt oder daß durch die in diesem Stadium nachgewiesene Polyploidisierung ein erhöhter Anteil dieser vergrößerten Kerne zerstört wird.

Das würde eine Verschiebung der RNS - Gehalte in der beobachteten Richtung zur Folge haben. Diese methodische Fehlermöglichkeit war jedoch weitgehend auszuschließen; es müßten sich in diesem Falle quantitativ gleiche DNS - Verschiebungen nachweisen lassen. Die DNS - Gehalte der Mikrosomenpräparation waren außerordentlich gering und bei Fraktionierung von Phenobarbitallebern nicht erhöht. Gegen eine erhöhte Labilität der Kerne in fremdstoffinduzierten Lebern sprechen ebenfalls Untersuchungen von Koranski et al., der bei Kernzählungen identische Ausbeuten in unbehandelten und in durch ~~Hexachlor~~Hexachlorcyclohexanbehandlung vergrößerten Lebern erhielt.

Aufgrund unserer Vorstellungen über den Ablauf einer Enzyminduktion wäre es naheliegend, anzunehmen, daß die beobachtete Verschiebung der RNS - Gehalte darauf beruht, daß durch die intensive Neubildung umfangreicher Enzymgruppen die Kapazität des Enzymsynthetisierenden Apparates sehr schnell erschöpft wird und daß dadurch eine Ausschleusung von Kern - RNS in den Extranuklearraum ausgelöst wird. Diese Vorstellung würde jedoch voraussetzen, daß sich im Ruhekern wesentliche Anteile präformierter spezifischer RNS - Formen befinden. Dafür gibt es bis jetzt keine experimentellen Hinweise.

Zu 2: Es darf sicher angenommen werden, daß die dem Abfall der RNS - Gehalte reziprok laufende Steigerung der RNS - Synthese in der Leber auf der schon nach wenigen Stunden nach Beginn der Phenobarbitaleinwirkung einsetzenden Neubildung mikrosomaler und bei Anwendung lebervergrößernder Dosen auch mitochondrialer und zytoplasmatischer Enzyme beruht (Remmer, Dissertation Mische). Eine dem Enzymanstieg vorausgehende Steigerung der Biosynthese von Kern - RNS wurde bei der Enzyminduktion durch Ecdyson in den Epidermiszellen von Calliphora (Karlson, Sekeris) und in der Leber von Warmblütern bei der Enzyminduktion durch Hydrocortison (Sekeris, Feigelson) gefunden. Die neusynthetisierte RNS besaß dabei eine hohe Messengeraktivität.

Bei der Mikrosomeninduktion durch Fremdstoffe konnte eine analoge Erhöhung der RNS - Synthese im Kern bisher nicht nachgewiesen werden. Conney et al. konnten in der phenobarbitalinduzierten Leber vor allem keine erhöhte mRNS - Bildung finden. Es wurde deshalb allgemein angenommen, daß die Neubildung der Mikrosomenenzyme ohne Kernbeteiligung an präformierten Strukturen stattfindet. Aus Kreuzversuchen mit Mikrosomen und Zytoplasma aus normaler und fremdstoffinduzierter Leber schließen Gelboin et al., daß die gesteigerte Enzymsynthese hier auf einer erhöhten Aktivität der Ribosomen beruhe. Als Ursache postulieren sie veränderte Membraneigenschaften. Remmer et al. führte die erhöhte Proteinsynthese auf eine experimentell nachgewiesene vermehrte Polysomenaggregation zurück.

Es ist aufgrund dieser Befunde zu diskutieren, ob die bei unseren Versuchen sicher nachweisbare Neubildung von 65^0 - RNS, die nach übereinstimmenden Analysen von Georgiev, Sekeris und nach eigenen Befunden überwiegend aus mRNS besteht, schon durch die Induktion mikrosomaler Enzyme ausgelöst wird, oder ob sie ein Äquivalent der Neubildung mikrosomaler und zytoplasmatischer Enzyme durch lebervergrößernde Phenobarbitaldosen darstellt. In orientierenden Versuchen mit einer kleinen Phenobarbitaldosis, die nur Mikrosomenenzyme induziert und keine Lebervergrößerung bewirkt, fanden wir eine quantitativ geringere, aber noch sicher nachweisbare Erhöhung der Inkorporation in die 65^0 - Fraktion von Kern und Mikrosomen. Dieser Befund bedarf noch der Bestätigung durch weitere Versuche. Er deutet jedoch darauf hin, daß die Induktion mikrosomaler und extramikrosomaler Enzyme nicht qualitativ verschieden abläuft, sondern daß nur quantitative Unterschiede bestehen, die im ersten Falle einen Nachweis erschweren. Die Mikrosomenenzyme stellen nur einen sehr geringen Anteil des Enzymbestandes der Zelle dar.

So liegt die Aktivität der mikrosomalen TPNH - Oxydase noch eine Zehnerpotenz unter der Aktivität der "kleinen Enzyme" wie etwa der Glukose - 6 - Phosphatdehydrogenase. Die vermehrte Synthese von mRNA bei der Mikrosomeninduktion dürfte deshalb die durch den normalen Enzymsatz bedingte mRNA - Neubildung nur wenig und schwer meßbar erhöhen. Es scheint denkbar, daß ein sicherer Nachweis nur bei der Maus möglich ist, bei der die Induktion der Mikrosomenenzyme sehr viel schneller verläuft als bei den großen Laboratoriumstieren, wie Ratte und Kaninchen, mit denen die oben genannten Autoren ihre Untersuchungen durchführten.

Für die bei unseren Untersuchungen, im Unterschied zu den Beobachtungen bei hormonaler Enzyminduktion (Karlson, Sekeris), sicher nachgewiesenen Steigerung der Synthese von ribosomaler und transfer - RNA muß ebenfalls diskutiert werden, ob hier generell verschiedene Mechanismen oder nur quantitative Unterschiede vorliegen. Es ist sehr gut denkbar, daß der außerordentliche Umfang von Enzymsynthesen bei Applikation lebervergrößernder Fremdstoffdosen nicht nur zur Vermehrung enzymspezifischer mRNA führt, sondern daß darüber hinaus eine Vergrößerung des gesamten enzymsynthetisierenden Apparates, also auch der ribosomalen Anteile ausgelöst wird. Gegen die ausschließliche Bedeutung dieser Annahme spricht allerdings, daß auch bei Zufuhr sehr kleiner, nur mikrosomeninduzierender Phenobarbitaldosen neben der gering erhöhten Markierung der 65^0 - Fraktionen eine sichere, in der Kernfraktion sogar deutlich stärkere Erhöhung des Einbaues in die 50^0 - Fraktion beobachtet wurde. (Anhangstabelle XV) Zu 3: Nach diesen Resultaten gewinnt das zweite, einleitend diskutierte Wirkungsprinzip an Wahrscheinlichkeit, daß die nahezu gleichzeitig erfolgende Synthese aller RNA - Fraktionen bei Einwirkung von Fremdstoffen nicht auf einer Kette von Enzyminduktionen beruht, sondern durch die direkte Auslösung generativer Zellvorgänge erfolgt.

Dafür spricht der Befund, daß etwa gleichzeitig mit der Stimulierung der RNS - Synthese auch eine intensive Neubildung von DNS erfolgt. Dieser Anstieg der DNS - Synthese in den ersten Tagen der Fremdstoffeinwirkung geht morphologisch mit einer Polyploidisierung und mit einer erhöhten Mitoseaktivität einher.

(Schaudé)

Von großer Bedeutung für die toxikologische Bewertung der Lebervergrößerung ist die Beobachtung, daß nach Abschluß der Wachstumsphase in der vergrößerten Leber der DNS - Umsatz, der ein Maß des Zell - turnover darstellt, sicher erniedrigt ist. Für die Annahme eines karcinogenen oder synkarcinogenen Effektes der lebervergrößernden Pharmaka besteht deshalb von der Analyse des DNS - Stoffwechsels her kein Anhalt.

Zusammenfassung

Bei 22 Albinomäusen wurden während des ganzen Verlaufes der durch chronische Phenobarbitalzufuhr induzierten Lebervergrößerung die Gehalte und die Neusynthese der Nukleinsäuren bestimmt. Nach einstündiger Pulsmarkierung mit den C^{14} und H^3 markierten Nukleinsäurevorstufen Uracil, Uridin, Orotsäure und Thymin wurden dazu aus Gesamtleber oder aus den Kern-, Mikrosomen- und Zytoplasmapräparationen die Nukleinsäuren mit Hilfe der fraktionierten Phenolextraktion nach Georgiev und Mantieva gewonnen. Die freien Nukleotide wurden als Bariumsalze nach Umbreit gefällt. In den gereinigten Präparationen wurden die Gesamtgehalte der Nukleotide und der Nukleinsäuren spektrophotometrisch, die RNS - Gehalte mit der Orcinmethode nach Maybaum und die DNS - Gehalte mit der Diphenylaminmethode nach Dische bestimmt. Die C^{14} - oder die H^3 - Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler ermittelt.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. Bei chronischer Applikation von 150mg/kg Phenobarbital täglich mit dem Trinkwasser kommt es bei Albinomäusen zu einer Vergrößerung der Leber von durchschnittlich 70 bis 80%. Das Organwachstum setzt 24 Stunden nach Applikation ein und erreicht am 5. bis 6. Tag ein Maximum, das auch bei weiterer Phenobarbitalzufuhr beibehalten wird.
2. Noch vor Beginn des Gewichtsanstieges, etwa 12 bis 16 Stunden nach der Phenobarbitalgabe, kommt es zu einer Abnahme der RNS - Gehalte des Kerns und zu einer annähernd reziproken Zunahme der RNS - Gehalte des Extranuklearraumes. Die Verschiebung der Gehalte findet sich in etwa gleichem Maße bei den nach Georgiev gewonnenen 50^0 - und 65^0 - Fraktionen. Sie erreicht ihr größtes Ausmaß am 3. Tag; nach Abschluß der Wachstumsphase nähern sich die RNS - Gehalte wieder zunehmend der Norm. In der vergrößerten Leber bleiben die RNS - Gehalte der Mikrosomenfraktionen gering erhöht, die Kern - RNS bleibt etwa der Verschiebung der Kern - Plasma - Relation entsprechend erniedrigt.

3. Gleichzeitig mit der Abnahme der Gehalte setzt eine intensive Neusynthese von RNS im Kern ein. Die Inkorporationsraten von Uracil, Uridin und Orotsäure sind in der vorwiegend die ribosomale RNS enthaltende 50⁰ - Fraktion und in der vorwiegend mRNS enthaltende 65⁰ - Fraktion in annähernd gleichem Ausmaß erhöht. Die Synthesemaxima werden bei beiden Fraktionen mit einer Steigerung von etwa 300% am 2. bis 3. Tag der Phenobarbitalwirkung erreicht. Die spezifische Aktivität ist wegen der Abnahme der Absolutgehalte noch stärker erhöht. Die Steigerung beträgt hier bei der 50⁰ - Fraktion 450%, bei der 65⁰ - Fraktion bis zu 700%.

4. Auch im Extranuklearraum ist eine statistisch sichere Steigerung der Inkorporation von RNS - Vorstufen in beide Georgievfraktionen der Mikrosomen und in die zytoplasmatische RNS nachweisbar. Der Syntheseanstieg folgt zeitlich dem Anstieg der Kern - RNS etwas nach; die Synthesemaxima sind bei Bezug auf das Lebergewicht wenig, bei Bezug auf die RNS - Gehalte deutlich geringer als die der entsprechenden Kernfraktion.

5. Etwa 24 Stunden nach Beginn der Phenobarbitalapplikation steigt der Einbau von Thymin und Orotsäure in die DNS des Kernes steil an. Die DNS - Synthese erreicht ebenfalls am 2. bis 3. Tag mit einer Erhöhung von 300% ihr Maximum.

6. Nach Abschluß der Wachstumsphase nähert sich der Einbau markierter Vorstufen bei allen Nukleinsäurefraktionen wieder der Norm. In der vergrößerten Leber liegt die RNS - Synthese im Bereich der bei Normaltieren gefundenen Größenordnung; die DNS - Synthese bleibt während eines Beobachtungszeitraumes von 24 Tagen erniedrigt.

Literaturverzeichnis

1. Brown, D.D. and Littna, E.(9) J. Mol. Biol. (1964) 8, 688-695
2. Brown, D.D. and Littna, E.(10) J. Mol. Biol. (1964) 8, 669-687
3. Busch, H., Hagashi, K.,
Jacob, S.T., Nakamura, T.,
Schwartz, S.M., and
Smith, S.J. (8) Molekular Biologie des malignen
Wachstums, S.17 Springer-Verlag
Heidelberg 1966
4. Gelboin, H.V. and Sokoloff, L. Science 134, 611-612 (1961)
5. Georgiev, G.P. und
Mantieva, V.L. (11) Biochim. et Biophys. Acta
61, 153 (1962)
6. Georgiev, G.P., Samarina, O.P.,
Lermann, M.I., Smirnow, M.N.
and Severtzov, A.N. (12) Nature December 28. (1963)
Sonderdruck
7. Hess, R., Stäubli, W. and
Riess, W. (5) Nature (Lond.), 856, 208
(1965)
8. Kunz, W., Schaudé, G., Schmid,
W., Siess, M. (1) Naunyn-Schmiedeberg's Arch.
Pharmak. u. exp. Path. 254
470-488 (1966)
9. Kunz, W., Schaudé, G. ,
Schimassek, H., Schmid, W.
and Siess, M. (2) Reprinted from Excerpta
Medica International Congress
Series No. 115
10. Lang, N. und Sekeris, C.E.(6) Hoppe-Seyler's Z. f. physiol.
Chemie Band 339, 238 (1964)
11. Miede Dissertation Pharmak. Institut
Marburg 1966

12. Peter, R. Zschr. f. Naturforschung 17b
164, 1962
13. Preis, Chr., Schaude, G.
und Siess, M. (4) Naunyn-Schmiedeberg's Arch.
Pharmak. u. exp. Path. 254
489-504 (1966)
14. Räker, O. Dissertation Pharmak. Institut
Marburg 1966
15. Remmer, H. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. für
exp. Path. u. Pharmak. Band 247
1964, 461 und 522
16. Remmer, H. u. Merker, H.J. (3) Klin. Wschr. 41, 276 (1963b)
17. Scherrer, K. and Darnell, J.E. Biochim. and Biophys. Research
Communications Vol.7 No.6 1964
18. Sekeris, C.E., Lang, N. und
Karlson, P. Hoppe-Seyler's Z. f. physiol.
Chemie, Band 341, S. 36-43, 1965
19. Steele, W.J. and Busch, H. (7) Biochim. et Biophys. Acta 501
20. Steele, W.J., Okamura, N.
and Busch, H. (7) Journal of Biological Chemistry
Vol. 240, No.4, April 1965
21. Umbreit, W.W., Burris, R.H.
et al. (13) Manometric Techniques and
Tissue Metabolism, Minneapolis,
Minn. Burges 1949

Tabelle I

RNS - Gehalte der Leber unbehandelter Tiere (17 Tiere)
Größenangabe in mg/g Leber und in mg/Gesamtleber eines 25g Tieres

	50° - Fraktion Kerne		65° - Fraktion Kerne		50° - Fraktion Mikrosomen		65° - Fraktion Mikrosomen		65° - Fraktion Plasma	
Tier Nr.	mg/g	mg/L25	mg/g	mg/L25	mg/g	mg/L25	mg/g	mg/L25	mg/g	mg/L25
1	0,5165	0,6534	0,2913	0,3685	5,3818	6,8080	0,7448	0,9422	0,2582	0,3266
2	1,4800	1,8248	0,2890	0,3563	6,5328	8,0550	0,1619	0,1996	1,6303	2,0102
3	0,9530	1,3533	0,2102	0,2985	3,2795	4,6569	0,2896	0,4112	0,7107	1,0083
4	0,3462	0,4362	0,0935	0,1178	3,3107	4,1715	0,9098	1,1463	0,6495	0,8183
5	0,6222	0,7777	0,4568	0,5710	5,2080	6,5100	1,8836	2,3545	0,9139	1,1491
6	0,4048	0,4615	0,3918	0,4466	4,7926	5,4635	1,6923	1,9292	1,3607	1,5512
7	0,6600	0,9801	0,2963	0,4400	3,3138	4,9210	0,6084	0,9035	0,9856	1,4636
8	0,5920	0,7204	0,2836	0,3451	3,0833	3,7524	1,2210	1,4859	0,7739	0,9418
9	0,4065	0,4919	1,2195	1,4756	5,3514	6,4873	1,8853	2,2812	0,8454	1,0229
10	1,1231	1,3163	0,9551	1,1194	4,0151	4,7057	1,5300	1,7932	0,9020	1,0571
11	0,5117	0,6023	0,2654	0,3154	4,3184	5,0827	1,5872	1,8681	1,5544	1,8295
12	0,5830	0,7404	0,2902	0,3685	4,7480	6,0300	0,6765	0,8591	0,5705	0,7248
13	0,4724	0,6953	0,4575	0,6734	5,0228	7,3936	1,3178	1,9398	1,0617	1,6628
14	0,8557	1,1809	0,3784	0,5222	3,9201	5,4097	0,9447	1,3037	1,0239	1,4130
15	1,1540	1,3756	1,1715	1,3964	5,1670	6,1591	0,8218	0,9796	0,8218	0,9796
16	1,1562	1,3646	0,3083	0,3638	4,8016	5,6659	0,6102	0,7200	1,2750	1,5045
17	1,0759	1,3664	0,3748	0,4760	4,1332	5,2491	0,4232	0,5375	1,2292	1,5611
M	0,7596	0,9612	0,4548	0,5677	4,4935	5,6777	1,0181	1,2738	0,9744	1,2308
$\bar{x} \pm$	0,3375	$\pm$ 0,4148	$\pm$ 0,3306	$\pm$ 0,3892	$\pm$ 0,9409	$\pm$ 0,3602	$\pm$ 0,5518	$\pm$ 0,6611	$\pm$ 0,3556	$\pm$ 0,4309
$\bar{x}_M \pm$	0,0844	$\pm$ 0,1037	$\pm$ 0,0826	$\pm$ 0,0973	$\pm$ 0,2352	$\pm$ 0,0900	$\pm$ 0,1379	$\pm$ 0,1653	$\pm$ 0,0889	$\pm$ 0,1077

Tabelle II

Einbaurrate markierter Vorstufen in die RNS der Leber
unbehandelter Tiere. Markierung mit radioaktivem Uracil.

Größenangabe in DpM/g Leber, in DpM/25g Leber und in
DpM/mg RNS

50° - Fraktion Kerne

65° - Fraktion Kerne

Anzahl der

Tiere	<u>DpM/g</u>	<u>DpM/25g</u>	<u>DpM/mgRNS</u>	<u>DpM/g</u>	<u>DpM/25g</u>	<u>DpM/mgRNS</u>
1	1109	1403	2149	883	1117	3036
2	1722	2233	5122	730	919	1125
3	1126	1408	1810	500	624	1094
4	841	959	2077	521	594	1328
5	1577	2342	2388	385	571	1301
6	1666	2027	2841	1214	1478	1115
7	1122	1357	2764	284	344	233
8	876	1278	1941	593	695	621
9	1018	1293	1746	300	462	926
10	833	1226	1764	371	546	810
11	1000	1379	1130	407	561	1075
12	928	1106	803	430	513	367
13	922	1087	797	519	613	1685
M	1254	1612	1942	573	724	1120
SE	± 344	± 467	± 766	± 206	± 244	± 464
SM	± 96	± 129	± 212	± 57	± 68	± 140

Tabelle III

Einbaurrate markierter Vorstufen in die RNS der Leber
unbehandelter Tiere. Markierung mit radioaktivem Uracil.

Größenangabe in DpM/g Leber, in DpM/25g Leber und in
DpM/mg RNS

50° - Fraktion Mikrosomen

65° - Fraktion Mikrosomen

Anzahl der

Tiere	DpM/g	DpM/25g	DpM/mgRNS	DpM/g	DpM/25g	DpM/mgRNS
1	224	284	304	193	244	258
2	1079	1359	325	870	1096	956
3	1328	1660	254	506	632	268
4	1317	1502	274	944	1076	558
5	1086	1612	327	238	353	390
6	1441	1754	467	517	629	422
7	1638	1981	304	464	562	245
8	498	584	123	364	427	238
9	1440	1829	302	249	316	367
10	2255	3318	448	444	653	337
11	975	1345	248	313	431	331
12	968	1153	186	363	433	442
13	1064	1255	221	431	509	706
M	1317	1683	298	462	577	442
8 E	± 523	± 746	± 99	± 219	± 255	± 211
8 M	± 145	± 207	± 27	± 58	± 67	± 55

Tabelle IV

Einbaurrate markierter Vorstufen in die RNS der Leber
unbehandelter Tiere. Markierung mit radioaktivem Uracil.
Größenangabe in DpM/g Leber, in DpM/25g Leber und in
DpM/mg RNS

 ^{65}O - Fraktion Plasma

Anzahl der Tiere	<u>DpM/g</u>	<u>DpM/25g</u>	<u>DpM/mgRNS</u>
1	310	392	1201
2	967	1219	1426
3	1310	1638	1424
4	871	2011	982
5	734	1090	745
6	866	1053	1118
7	689	832	815
8	738	865	818
9	541	687	948
10	951	1401	896
11	896	1236	875
12	719	857	874
13	<u>1047</u>	<u>1236</u>	<u>821</u>
M	855	1091	966
δE	± 285	± 369	± 253
δM	± 72	± 102	± 70

RNS - Gehalte der Leber Phenobarbital - behandelter Tiere.(Uracilversuchsreihe
Dauer der Phenobarbitalbehandlung 12 Stunden - 27 Tage.Phenobarbitalgabe 150mg/kg pro Tag.
Größenangabe in mg/g Leber und in mg/Gesamtleber eines 25g Tieres.

Tier Nr.	50° - Fraktion		65° - Fraktion		50° - Fraktion		65° - Fraktion		65° - Fraktion	
	mg/g	mg/L25	mg/g	mg/L25	mg/g	mg/L25	mg/g	mg/L25	mg/g	mg/L25
2 - 14 Std										
1	0,5349	0,7051	0,2396	0,3152	4,0761	5,3682	0,1114	0,1467	0,2451	0,3228
2	1,4165	2,2140	0,1832	0,2863	6,4884	10,1413	0,0983	0,1536	1,4657	2,2909
3	1,2390	1,6664	0,1598	0,2149	7,6345	10,2684	0,0742	0,0998	1,4275	1,9200
4	1,3582	1,6067	0,1288	0,1524	6,8028	8,0477	0,0693	0,0820	1,5455	1,8283
Tag										
1	0,2997	0,4382	0,0449	0,0657	3,0619	4,4765	1,1134	1,6278	0,5374	0,7857
2	0,5486	0,7390	0,2312	0,3114	4,7726	6,4287	1,8081	2,4355	1,0603	1,4282
3	0,4975	0,6691	0,2662	0,3580	5,0454	6,7860	1,8219	2,4504	0,6119	0,8230
4	0,4911	0,5706	0,2151	0,2499	6,6793	7,7613	1,5775	1,8330	0,8783	1,0206
5	0,3214	0,4733	0,2701	0,3957	6,0429	8,8528	2,8553	4,1830	1,0881	1,5940
6	0,3779	0,4950	0,2596	0,3400	5,4551	7,1462	2,7932	3,6591	0,9628	1,2612
7	0,3514	0,5471	0,3502	0,5452	5,9776	9,3071	-	-	1,1737	1,8274
8	0,6410	1,0032	0,2624	0,4106	4,6465	7,2718	1,2390	1,9390	1,0325	1,6158
9	0,7583	1,0806	0,1878	0,2676	4,5193	6,4400	0,7982	1,1374	1,0846	1,5455
10	0,4767	0,7508	0,1250	0,1968	4,3750	6,8906	0,9607	1,5131	0,9964	1,5693
Tag										
1	0,3069	0,4748	0,1828	0,2828	3,6957	5,7172	2,1401	3,3108	0,6138	0,9495
2	0,2900	0,4501	0,1550	0,2406	3,6500	5,6648	1,7125	2,6578	0,6275	0,9739
3	0,2825	0,4223	0,1750	0,2616	3,5050	5,2400	1,5825	2,0668	0,5850	0,8746
4	0,6343	1,2318	0,6779	1,3165	5,5975	10,8703	0,6530	1,2681	0,7587	1,4734
5	0,6717	1,2137	0,5799	1,0788	5,3811	9,7236	1,0523	1,9015	0,7314	1,3216
6	0,4643	0,8613	0,7322	1,3582	4,4173	3,1941	1,3878	2,5744	0,6965	1,2920
Tag										
1	0,5576	0,6173	0,1607	0,1779	5,8550	6,4815	1,5252	1,6884	1,2070	1,3361
2	0,3459	0,5880	0,1350	0,2295	4,2550	7,2335	1,2376	2,1039	0,7585	1,2894
3	0,5169	0,5221	0,2759	0,2786	7,3106	7,3837	0,9211	0,9303	1,0182	1,0284
4	0,7756	1,1944	0,3246	0,4999	4,8404	7,4542	0,5170	0,7962	0,8100	1,2474
5	0,5390	0,8042	0,2743	0,4092	5,3805	8,0426	0,7081	1,0565	0,6762	1,0089
6	0,5441	0,7944	0,1877	0,2740	4,9242	7,1893	0,5767	0,8420	0,5604	0,8182
7	0,4389	0,7659	0,1704	0,2973	4,4436	7,7541	1,7230	3,0066	0,6928	1,2089
8	0,4625	0,6831	0,1438	0,2124	4,0847	6,0331	1,6323	2,4109	0,8084	1,1940
9	0,4459	0,8793	0,1193	0,2353	3,9121	7,7147	1,3924	2,7458	0,8288	1,6344
10	0,7664	1,2262	0,2149	0,3438	4,3427	6,9483	0,9792	1,5667	1,1139	1,7822
11	0,5785	1,0326	0,1778	0,3174	3,4453	6,1499	1,2395	2,2125	1,0261	1,8316
12	0,5836	1,1876	0,1170	0,2381	3,3723	6,8622	0,7983	1,6245	0,9910	2,0167
Tag										
1	0,7905	1,2529	0,6173	0,9784	3,4842	5,5224	0,1365	0,2163	1,2183	1,9310
2	0,6408	1,2399	0,5170	1,0004	3,4357	6,6481	0,1007	0,1948	1,1694	2,2628
3	0,6432	1,2973	0,4745	0,9571	2,4134	4,8678	0,1220	0,2461	0,8963	1,8078
Tag										
1	1,3741	2,8719	0,2052	0,4289	5,1455	10,7541	0,5859	1,2245	1,4514	3,0334
2	1,5015	2,7973	0,2198	0,4095	7,2797	13,5621	0,8793	1,6381	1,5015	2,7973
3	1,1121	2,5334	0,1502	0,3422	5,4551	12,4267	0,5534	1,2606	1,3176	3,0015

Tabelle VI

Einbauraten markierter Vorstufen in die RNS der Leber
 Phenobarbital - behandelte Tiere, Dauer der Phenobarbital-
 Behandlung 12 Stunden - 27 Tage, Phenobarbitalgabe 150mg/kg
 pro Tag, Markierung mit radioaktivem Uracil.
 Größenangaben in DpM/g Leber, in DpM/25g Leber und in
 DpM/mg RNS.

50⁰ - Fraktion Kerne65⁰ - Fraktion Kerne

Anzahl der Tiere

12 - 14 Std	<u>DpM/g</u>	<u>DpM/25g</u>	<u>DpM/mgRNS</u>	<u>DpM/g</u>	<u>DpM/25g</u>	<u>DpM/mgRNS</u>
1.	926	1220	1731	733	965	3069
2	5661	8849	3997	725	1134	3960
3	7957	10703	6423	881	1186	5517
4	6539	7737	4815	754	892	5857
1. Tag						
1.	2409	3521	8056	450	658	10009
2	1420	1912	2590	640	862	2760
3	4294	5776	8638	1712	2302	6436
4	2186	2540	4452	1018	1182	4734
5	2811	4118	17903	744	1091	2757
6	2042	2676	5416	618	809	2385
7	2258	3516	6432	495	771	1415
8	5008	7832	7812	736	1151	5622
9	2310	3292	3048	371	528	3944
10	3120	4913	6554	602	949	9718
2 Tage						
1	2345	3627	7636	741	1148	4053
2	2168	3365	7475	640	993	4129
3	2708	4049	9604	749	1119	4278
4	3295	5955	4903	631	1141	1057
5	3921	7389	8450	793	1471	1082

Fortsetzung nächstes Blatt

Fortsetzung von Tabelle VI

50° - Fraktion Kerne

65° - Fraktion Kerne

Anzahl der Tiere

3 Tage	<u>DpM/g</u>	<u>DpM/25g</u>	<u>DpM/mgRNS</u>	<u>DpM/g</u>	<u>DpM/25g</u>	<u>DpM/mgRNS</u>
1	4624	5118	8292	1350	1494	8401
2	5316	9036	15360	2860	4862	21185
3	3686	3722	7130	1478	1492	5357
4	1766	2719	2278	300	462	926
5	1294	1931	2401	629	875	2295
6	4425	6459	8133	626	913	3346
7	3269	5704	7447	419	731	2466
8	2040	3013	4415	352	520	2446
9	2763	5449	6195	527	1039	4431
10	1111	1779	1450	304	486	1419
11	1606	2867	2778	399	714	2257
12	1519	3090	2606	367	746	3133
8 Tage						
1	5051	8007	6390	693	1099	1123
2	4907	11358	7657	632	1223	1223
3	4244	8559	6598	714	1441	1505
27 Tage						
1	1360	2841	989	280	586	1366
2	1431	2667	954	268	500	1222
3	1051	2393	945	177	404	1182

Tabelle VII

Einbaurate markierter Vorstufen in die RNS der Leber
Phenobarbital - behandelte Tiere. Dauer der Phenobarbital-
behandlung 12 Stunden - 27 Tage. Phenobarbitalgabe 150mg/kg
pro Tag. Markierung mit radioaktivem Uracil.

Größenangabe in DpM/g Leber, in DpM/25g Leber und in
DpM/mg RNS.

50° - Fraktion Mikrosomen

65° - Fraktion Mikrosomen

Anzahl der Tiere

12 - 14 Std	<u>DpM/g</u>	<u>DpM/25g</u>	<u>DpM/mgRNS</u>	<u>DpM/g</u>	<u>DpM/25g</u>	<u>DpM/mgRNS</u>
1	317	417	77	207	272	1865
2	2389	3734	368	728	1138	7413
3	3763	5061	493	878	1181	11838
4	3398	4020	498	675	798	9742
1 Tag						
1	1522	2225	496	1620	2369	1455
2	1436	1934	300	494	666	272
3	4034	5426	798	1004	1400	550
4	2158	2508	322	668	776	422
5	6204	9089	1026	3612	5292	1265
6	3120	3956	553	2103	2755	753
7, 3, 6, 13	3613	5626	603	-	-	-
8	2396	3747	515	486	760	391
9	1307	1862	288	337	480	421
10	1779	2802	406	356	561	371
2 Tage						
1	3815	5902	1032	1642	2541	767
2	2495	3873	683	806	1251	470
3	5442	8135	1552	2177	3255	1575
4	1635	2958	303	437	790	415
5	1688	3131	382	518	961	373

Fortsetzung nächstes Blatt

Fortsetzung von Tabelle VII

50° - Fraktion Mikrosomen

65° - Fraktion Mikrosomen

Anzahl der Tiere

3 Tage	<u>DpM/g</u>	<u>DpM/25g</u>	<u>DpM/mgRNS</u>	<u>DpM/g</u>	<u>DpM/25g</u>	<u>DpM/mgRNS</u>
1	10552	11680	1802	1980	2192	1298
2	7040	11968	1654	1136	1899	918
3	4974	5024	—	1172	1184	1272
4	13449	20712	2778	1083	1668	2096
5	2942	4389	545	560	837	792
6	6139	8964	1246	500	729	867
7	1699	2965	382	427	754	247
8	5174	7642	1267	583	861	356
9	4433	8741	1133	710	1402	510
10	1008	1614	232	303	485	309
11	1094	1954	317	395	706	318
12	1571	3195	465	253	515	317
8 Tage						
1	4383	6946	1257	790	1252	5793
2	3207	6205	933	697	1349	6927
3	3437	6931	1423	611	1232	5008
27 Tage						
1	1300	2716	252	157	328	268
2	1233	2298	169	262	487	297
3	1123	2559	205	138	314	249

Tabelle VIII

Einbaurate markierter Vorstufen in die RNS der Leber
 Phenobarbital - behandelte Tiere. Dauer der Phenobarbital-
 behandlung 12 Stunden - 27 Tage. Phenobarbitalgabe 150mg/kg
 pro Tag. Markierung mit radioaktivem Uracil.
 Größenangabe in DpM/g Leber, in DpM/25g Leber und in
 DpM/mg RNS.

65° - Fraktion Plasma

Anzahl der Tiere	<u>DpM/g</u>	<u>DpM/25g</u>	<u>DpM/mgRNS</u>
12 - 14 Std			
1	319	420	1303
2	917	1503	656
3	1304	1753	913
4	861	1019	557
1 Tag			
1	2412	3526	4125
2	2036	2742	1920
3	1950	2622	3186
4	2208	2566	2514
5	11780	17257	10826
6	6472	8479	6728
7	7123	11091	6072
8	1263	1975	1223
9	908	1452	837
10	1049	2693	1054
11			
2 Tage			
1	1316	2036	2143
2	731	1135	1165
3	1014	1516	1734
4	1184	2143	1620
5	1250	2319	1796

Fortsetzung nächstes Blatt

Fortsetzung von Tabelle VIII

65^0 - Fraktion Plasma

Anzahl der Tiere	<u>DpM/g</u>	<u>DpM/25g</u>	<u>DpM/mgRNS</u>
3 Tage			
1	5960	6598	4938
2	3268	5556	4310
3	4388	4432	4310
4	535	824	660
5	1259	1878	932
6	589	860	1051
7	476	830	686
8	693	1024	857
9	717	1413	864
10	974	1560	875
11	860	1536	837
12	931	1894	836
8 Tage			
1	3578	5671	2937
2	3017	5838	2580
3	2971	5993	3315
27 Tage			
1	258	541	178
2	235	438	157
3	231	526	175

Tabelle IX

RNS - Gehalte der Leber Phenobarbital - behandelter Tiere. (Uridin und Orotsäureversuchsreihen)
 Dauer der Phenobarbitalbehandlung 12 Stunden - 24 Tage. Phenobarbitalgabe 150mg/kg pro Tag.
 Größenangabe in mg/g Leber und im mg/Gesamtleber eines 25g Tieres.

Tier Nr.	50° - Fraktion			50° - Fraktion			65° - Fraktion			65° - Fraktion		
	mg/g	mg/L25	Kerne	mg/g	mg/L25	Mikrosomen	mg/g	mg/L25	Mikrosomen	mg/g	mg/L25	Plasma
Uridin												
1 Tag												
1	1,2062	1,6284	0,2736	5,8887	7,9497	0,6474	0,8740			1,9462	2,6274	
2	1,4175	2,1121	0,2563	5,8662	8,7406		1,1908			1,8925	2,8198	
3	1,4781	2,1758	0,2506	5,8692	8,6395		0,8928			-	-	
7 Tage												
1	1,8729	3,3057	0,2904	4,2427	7,4883	1,7104	3,0188			2,0449	3,6092	
2	2,1437	3,0162	0,2783	5,9182	8,3269	1,6614	2,3376			2,1064	2,9637	
3	1,5432	3,1589	0,1777	4,2789	8,7589	1,3292	2,7209			1,8562	3,7996	
Orotsäure												
12 Stunden												
1			2,2010	3,0220		65° - Gesamtfraction				65° - Fraktion		
2			3,2118	4,4365						1,5179	2,0841	
3			2,7158	3,5794						1,3618	1,9065	
4			1,1621	1,5549						1,3498	1,7790	
5			1,2939	1,7312						2,1108	2,8242	
6			1,2210	1,7949						1,7217	2,3036	
24 Tage										1,7066	2,5087	
1			0,4593	0,9866						0,9091	1,9527	
2			0,4710	0,8633						0,8635	1,5828	
3			0,4281	0,8134						0,9625	1,8287	

Tabelle X Einbauraten markierter Vorstufen in die RNS der Leber
 Phenobarbital - behandelte Tiere. Dauer der Phenobarbital-
 behandlung 1 Tag und 7 Tage. Phenobarbitalgabe 150mg/kg pro
 Tag. Markierung mit Uridin H^3 .
 Größenangaben in DpM/g Leber, in DpM/25g Leber und in
 DpM/mg RNS.

50 ⁰ - Fraktion Kerne				65 ⁰ - Fraktion Kerne		
Anzahl der Tiere	DpM/g	DpM/25g	DpM/mgRNS	DpM/g	DpM/25g	DpM/mgRNS
1. Tag						
1	119430	161231	99014	10962	14799	40066
2	95186	141827	67150	7782	11596	30362
3	130166	191604	88062	12352	18183	49290
7 Tage						
1	32514	57387	17360	2356	4159	8113
2	66796	93981	31158	3523	4957	12660
3	35988	73668	23321	2019	4133	11362
50 ⁰ - Fraktion Mikrosomen				65 ⁰ - Fraktion Mikrosomen		
1 Tag						
1	62062	83784	10540	7010	9463	10827
2	46476	69250	7922	5582	8317	6985
3	41166	60592	7014	4683	6894	7722
7 Tage						
1	30946	54620	7341	3264	5760	1908
2	20883	29382	3529	4418	6216	2659
3	14756	30206	3449	1288	2638	969
				65 ⁰ - Fraktion Plasma		
1 Tag						
1				16307	22014	8378
2				12577	18739	6646
3				-	-	-
7 Tage						
1				7327	12933	3584
2				11806	16611	5605
3				3731	7600	2000

Tabelle XI

Einbaurrate markierter Vorstufen in die RNS der Leber
 Phenobarbital - behandelte Tiere. Dauer der Phenobarbital-
 behandlung 12 Stunden und 24 Tage. Phenobarbitalgabe 150mg/kg
 pro Tag. Markierung mit Orotsäure 5 - H^3
 Größenangabe in DpM/g Leber, in DpM/25g Leber und in
 DpM/mg RNS.

65° - Gesamtfraktion Kerne				65° - Gesamtfraktion Mikrosomen		
Anzahl der Tiere	DpM/g	DpM/25g	DpM/mgRNS	DpM/g	DpM/25g	DpM/mgRNS
12 Std						
1	21177	29076	9621	10774	14792	1441
2	16262	22766	5063	6283	8796	885
3	18145	23916	6681	6676	8798	887
4	9472	12673	8150	6353	8500	817
5	11208	14997	8663	5771	7721	762
6	7771	11424	6364	4491	6602	635
24 Tage						
1	4569	9814	9947	4061	8724	806
2	5419	9933	11506	5305	8998	1182
3	6475	12303	15126	4490	8532	977
65° - Fraktion Plasma						
12 Std						
1	3183	4371	2097			
2	1511	2115	1110			
3	1782	2348	1319			
4	2189	2930	1037			
5	2079	2782	1207			
6	1315	1934	771			
24 Tage						
1	1066	2288	1172			
2	1599	2931	1852			
3	1317	2502	1368			

Tabelle XII

DNS - Gehalte der Leber und Einbaurate markierter Vorstufen in die Leber unbehandelter Tiere. Markierung mit Thymin U- H^3 . Größenangabe der DNS - Gehalte in mg/g Leber und in mg/Gesamt-leber eines 25g Tieres. Einbaurate in DpM/g Leber, in DpM/25g Leber und in DpM/mg DNS.

Anzahl der Tiere	Gesamtfraction		Gesamtfraction		
	mg/g	mg/L25	DpM/g	Dpm/25g	DpM/mgDNS
1			2613	3253	2278
2			240	346	173
3	2,0357	2,4276	6255	7455	2141
4	1,6322	2,2075	2843	3843	1296
5	2,4729	3,3631	714	970	289
6	3,2509	3,8117	2618	3070	806
7	3,7717	4,5072	1074	1284	285
8	2,1155	2,4857	1401	1646	662
9	2,5540	2,8094	2607	2868	1020
10	<u>1,7460</u>	<u>2,4444</u>	<u>3912</u>	<u>5476</u>	<u>1435</u>
M	2,4473	3,0070	2427	3021	1039
ΔE	± 0,741	± 0,813	± 5551	± 6889	± 749
ΔM	± 0,264	± 0,290	± 1734	± 2152	± 234

Tabelle XIII

DNS - Gehalte der Leber und Einbaurate markierter Vorstufen in die Leber Phenobarbital - behandelte Tiere. Dauer der Phenobarbitalbehandlung 14 Stunden - 15 Tage. Phenobarbitalgabe 150mg/kg pro Tag. Markierung mit Thymin U- H^3 . Größenangabe der DNS - Gehalte in mg/g Leber und in mg/Gesamt-leber eines 25g Tieres. Einbaurate in DpM/g Leber, in DpM/25g Leber und in DpM/mg DNS.

Anzahl der Tiere	Gesamtfraktion		Gesamtfraktion		
	mg/g	mg/25g	DpM/g	DpM/25g	DpM/mgDNS
14 Stunden					
1	2,0740	2,9295	3757	5306	1351
2	1,9629	2,9002	3398	5019	1547
3	1,3745	2,0308	2084	3078	1196
4	1,8654	2,3131	2701	3350	1063
5	1,6760	2,4637	2003	2944	769
6	1,8336	2,6679	2381	3465	1036
1 Tag					
1	2,1743	2,6689	2033	2495	935
2	2,2070	2,4167	1596	1748	792
3	1,7100	2,1418	1327	1661	972
2 Tage					
1	1,3808	2,1713	4682	7363	3391
2	1,1983	2,0401	2909	4959	2428
3	1,1520	2,0707	1815	3262	1575
3 Tage					
1	0,9192	1,6362	1072	1909	1166
2	1,0419	1,6095	961	1561	922
3	0,8659	1,4266	555	915	641
4 Tage					
1	0,5044	0,8852	806	1415	1598
2	0,3631	0,6926	624	1190	1718
3	0,4905	0,9761	857	1706	1747

Fortsetzung nächstes Blatt

Fortsetzung von Tabelle XIII

Anzahl der Tiere	Gesamtfraktion		Gesamtfraktion		
	<u>mg/g</u>	<u>mg/L25</u>	<u>DpM/g</u>	<u>DpM/25g</u>	<u>DpM/mgDNS</u>
9 Tage					
1	1,2785	2,2182	2074	3597	1622
2	1,5080	2,8086	2100	3912	1392
3	1,3755	2,6857	2350	4588	1708
15 Tage					
1	1,6536	3,1212	1440	2717	700
2	1,1988	2,2597	1462	2754	851
3	1,1890	2,4672	1111	2305	677
4	1,6494	3,1095	1133	2136	520
5	1,1546	1,9513	757	1278	434

Tabelle XIV

DNS - Gehalte der Leber und Einbaurate markierter Vorstufen in die Leber Phenobarbital - behandelte Tiere. Dauer der Phenobarbitalbehandlung 12 Stunden - 24 Tage. Phenobarbitalgabe 150mg/kg pro Tag. Markierung mit Orotsäure 5- H^3 . Entfernung der RNS durch Behandlung mit Ribonuclease. Größenangabe der DNS - Gehalte in mg/g Leber und in mg/Gesamtleber eines 25g Tieres. Einbaurate in DpM/g Leber, in DpM/25g Leber und in DpM/mg DNS.

Anzahl der Tiere	Kernfraktion		Kernfraktion		
	<u>mg/g</u>	<u>mg/L25</u>	<u>DpM/g</u>	<u>DpM/25g</u>	<u>DpM/mgDNS</u>
12 Stunden					
1	1,1224	1,5411	3815	5238	3399
2	1,2825	1,7955	1829	2561	1426
3	0,8550	1,1269	1634	2155	1912
4	1,7100	2,2880	439	587	256
5	0,9489	1,2696	457	611	481
6	1,4706	2,1618	340	500	232
24 Tage					
1	1,8036	3,8741	216	464	120
2	2,9278	5,3667	245	449	83
3	2,5766	4,8955	302	574	117

Tabelle XV

Einbaurrate markierter Vorstufen in die RNS der Leber
 Phenobarbital - behandelte Tiere. Dauer der Pheno-
 barbitalbehandlung 3 Tage. Phenobarbitalgabe 15mg/kg
 pro Tag. Markierung mit radioaktivem Uracil.
 Größenangaben in DpM/g Leber, in DpM/25g Leber und in
 DpM/mg RNS.

Fraktionen		Kontrolle	1. Tier	2. Tier	3. Tier
Kerne	DpM/g	922	1036	1246	1499
	50 ⁰ DpM/L25	1087	1421	1632	1817
	DpM/mg RNS	797	1252	1778	3864
65 ⁰	DpM/g	519	347	369	231
	DpM/L25	613	476	484	281
	DpM/mg RNS	1685	1660	2844	1535
Mikros.	DpM/g	1064	781	935	1150
	50 ⁰ DpM/L25	1255	1072	1224	1394
	DpM/mg RNS	211	160	195	215
65 ⁰	DpM/g	431	326	375	459
	DpM/L25	509	448	491	556
	DpM/mg RNS	706	561	649	559
Plasma	DpM/g	1047	727	935	1164
	DpM/L25	1236	997	1225	1410
	DpM/mg RNS	821	653	724	1028

Zum Schluß der Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Kunz für die Überlassung des Themas und für sein verständnisvolles Entgegenkommen herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Schmid danke ich für die Übernahme des Correferates.

Lebenslauf

Am 24. 12. 1930 wurde ich in Alt-Tschau, Kreis Freystadt/Niederschlesien als Sohn des Modellschlossermeisters Paul Schulz und seiner Ehefrau Mathilde, geb. Hanke geboren. Von 1937 bis 1941 besuchte ich die Volksschule in Sprottau am Bober und von 1941 bis zu meiner Flucht 1945 die Städtische Oberschule für Jungen. Nach fast zweijährigem Aufenthalt in der Tschechoslowakei wurde meine Familie nach Thale/Harz umgesiedelt. Dort besuchte ich von 1946 bis 1949 die Oberschule, an der ich 1949 das Abitur bestand. Im gleichen Jahr nahm ich das Medizinstudium an der Universität in Halle auf, wo mir im Dezember 1952 die Studierenerlaubnis entzogen wurde. Nachdem wiederholte Versuche, das Studium wieder aufzunehmen, fehlschlugen, begann ich im November 1954 an der Freien Universität Berlin erneut mit dem Studium, das ich nach einem Semester in Innsbruck im Wintersemester 1957 an der Universität Marburg fortsetzte und im August 1964 mit dem Staatsexamen beendete.

Seit 1953 bin ich verheiratet und habe zwei Töchter im Alter von neun und sieben Jahren.

Meine Pflichtassistentenzeit absolvierte ich von August 1964 bis August 1966 am Stadtkrankenhaus Hüttental - Weidenau. Vom 1. 9. 1966 an bin ich mit der Verwaltung einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am Pharmakologischen Institut der Universität Marburg betraut.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

An der Universität Halle

Hanson, G. Hertwig, P. Hertwig, Lautsch, Lüttringhaus, Lueken, Messerschmidt, Voss,

An der Freien Universität Berlin

Fischer, v. Herrath, Schütte, Schwarz,

An der Universität Innsbruck

Sauser, Schröcksnadel, Steinmayer, Stöhr,

An der Universität Marburg

Beckmann, Berendes, Bock, Braun - Falco, Bücher, Dimroth, Exner, Förster, Gedigk, Gross, Hamm, Hartmann, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hornung, Huber, Jacob, Kessler, Lang, Linneweh, Lübbers, Mahr, v. Manger - König, Maurath, du Mesnil, Meyer, Müller, Neubauer, Niessing, Nieth, Oehmig, Petry, Prinz, Queck, Schmid, Schmitz, Schölmerich, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Spiegelberg, Straub, Streicher, Vogt, Walcher, Würterle.

